



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA



LABORATORIO DE CARDIOLOGIA MOLECULAR

TESIS

*“Caracterización de la mutación R1032W y T337S en el gen KCNH2
codificante para el canal de potasio dependiente de voltaje HERG”*

Que para obtener el título de Licenciado en Biomedicina

PRESENTA:

BALDUINO BARRALES FUENTES

Director de Tesis:

Dr. JOSÉ EVERARDO AVELINO CRUZ

INDICE

INDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.I Canales iónicos.....	4
II.II Canalopatías y Síndrome del QT largo.....	5
II.III Canales de potasio K^+	9
II.IV Canales de K^+ dependientes de voltaje.....	10
II.V HERG.....	12
II.VI Proteína HERG.....	13
II.VII Génesis y tráfico del canal K_v 11.1.....	15
II.VIII Degradación de ARNm y Proteínas.....	16
II.IX Isoformas de KCNH2.....	16
II.X Canales K_v 11.1.....	17
II.XI Potencial de acción cardiaco.....	18
II.XII Corrientes repolarizantes del potencial de acción cardiaco.....	21
II.XIII Rol fisiológico de HERG.....	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
V. HIPOTESIS.....	27
VI. OBJETIVOS.....	27
VI.I Objetivo general.....	27

VI.II	<i>Objetivo específico</i>	27
VII.	<i>DIAGRAMA DE TRABAJO</i> :.....	28
VIII.	<i>METODOLOGÍA</i>	29
VIII.I	<i>ADN del canal de potasio HERG</i>	30
VIII.II	<i>Cultivo y mantenimiento de la línea celular Human Embryonic Kidney HEK 293A</i>	32
VIII.III	<i>Transfección</i>	32
VIII.IV	<i>Western Blot</i>	34
VIII.V	<i>Obtención de proteínas</i>	34
VIII.VI	<i>Cuantificación de proteínas</i>	35
VIII.VII	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	38
VIII.VIII	<i>Transferencia e Inmunodetección</i>	41
VIII.IX	<i>Marcaje con anticuerpos</i>	43
VIII.XI	<i>Electrofisiología</i>	47
IX.	<i>ANÁLISIS DE DATOS</i>	49
X.	<i>ASPECTOS BIOÉTICOS</i>	50
XI.	<i>RESULTADOS</i>	51
XI.I	<i>Expresión de la forma nativa del canal de potasio HERG y de las mutantes HERG R1032W y HERG T337S en la línea celular HEK 293</i>	52
XI.II	<i>Funcionalidad del canal de potasio HERG en la línea celular HEK 293A</i>	55
XI.III	<i>Cambios en la expresión de proteínas mutantes con respecto a las proteínas nativas del canal de potasio HERG</i>	67
XII.	<i>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i>	72
XIII.	<i>CONCLUSIONES</i>	78
XIV.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	79

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico cerrado
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
Anti- β -actina	Anticuerpo contra β -actina
Anti-Kv 11.1	Anticuerpo contra el Kv 11.1
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Ácido bicinconinico
BLB/c	Cepa de ratón
Ca ²⁺	Ion calcio
Cav	Canales de calcio activados por voltaje
CFTR	Canal de cloro regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CHIP	Proteína de interacción con el COOH- terminal
cNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNG	Canales activados por nucleótidos cíclicos
CO ₂	Dióxido de carbono
COOH-	Dominio carboxilo terminal
CPVT	Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
Cu ²⁺	Iones cobre
CuSO ₄	Sulfato cúprico
DAPI	Marcador fluorescente del núcleo
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
EGTA	Ácido tetraacético etilenglicol
F	Fenilalanina
G	Glicina
g	Gravedades
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HCN	Canales catiónicos activados por hiperpolarización
HEK 293	Células humanas embrionarias de riñón
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperasinetanosulfónico
HERG	Gen humano relacionado a éter a go go
HRP	Peroxidasa de rabano
HsP/c70 y 90	Proteínas de choque térmico 70 y 90
I	Corriente
IgG1	Inmunoglobulina G 1
I _K	Corriente rectificadora
I _{Kr}	Corriente de potasio rectificadora tardía

I_{Ks}	Corriente rectificadora lenta de potasio
I_{to}	Corriente transitoria saliente de potasio
$I_{to,fast}$	Corriente transitoria saliente rápida
$I_{to,slow}$	Corriente transitoria saliente lenta
K	Tasa de cambio de la corriente con respecto al voltaje
K^+	Ion potasio
K-aspartato	Aspartato de potasio
Kb	Kilo pares de bases
KCl	Cloruro de potasio
KCNE2	Canal de potasio auxiliar o beta
KCNH2	Gen de la proteína HERG
KCNH2-1a	Isoforma 1a de KCNH2
KCNH2-1b	Isoforma 1b de KCNH2
KCNH2-3.1	Isoforma 3.1 de KCNH2
KCNQ1	Gen del canal lento de potasio
KDa	Kilo daltones
KHz	Kilo Hertz
Kir 2.X	Rectificadores entrantes
KOH	Hidróxido de potasio
Kv 11.1	Proteína HERG
$Kv \beta$	Subunidad auxiliar beta
La^{3+}	Ion lantano
m	metro
mg	Mili gramos
Mg^{2+}	Ion magnesio
MgATP	Adenosin trifosfato de magnesio
MgCl	Cloruro de magnesio
MiRP1	Péptido relacionado a MINK 2
ml	Mili litros
mm	Mili metros
mM	Mili molar
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propansulfónico
ms	Milisegundos
mV	Mili voltios
$M\Omega$	Mega Ohms
n	Tamaño de la muestra
Na^+	Ion sodio
NH2	Dominio amino terminal
nm	Nanometros
P	Poros de conducción
p	Valor de significancia

pA	Pico amperios
PAS	Dominio Per-Arnt-Sim
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pF	Pico faradios
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
QT	Segmento QT en el electrocardiograma
R1032W	Mutación en el aminoácido arginina1032 a triptofano
RyR	Receptor a ryanodina
s	Segundo
S1-S6	Segmentos intracelulares 1-6
SBF	Suero Bovino Fetal
SBr	Síndrome de Brugada
SCN5A	Gen del canal de sodio activado por voltaje 1.5
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SQTL	Síndrome del QT largo
T337S	Mutación en el aminoácido treonina 337 a serina
TBST	Buffer salino Tris con Tween
TdP	Torsades de Pointes
UTR	Región no traducida
V	Voltaje
V	Volts
$V_{1/2}$	Voltaje medio de activación
WT	Wild type o nativa
Y	Tirosina
α	alfa
β	beta
μ g	Micro gramos
μ l	Micro litros

RESUMEN

El gen KCNH2 o HERG, codifica para el canal de potasio Kv 11.1, el cual origina la corriente de potasio I_{Kr} y en los humanos tiene una importante función en la fase repolarización del potencial de acción cardiaco. El Síndrome del QT largo, es una patología que se caracteriza por una prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma y predispone a arritmias cardiacas. Este síndrome, cuando es de origen hereditario, es resultado de mutaciones en algunos de los canales iónicos que participan en el potencial de acción cardiaco, siendo los tres principales el SCN5A, KCNQ1 y KCNH2. En este trabajo planeamos estudiar mediante técnicas de electrofisiología, biología celular y molecular, las mutaciones R1032W Y T337S del gen KCNH2. Ambas mutaciones no han sido previamente descritas y su estudio nos brindará información acerca del funcionamiento del canal de potasio y de su posible implicación en la generación de cuadros arritmogénicos.

El canal Wild Type de HERG y las mutantes R1032W y T337S fueron expresadas en células HEK 293A mediante transfección. Para corroborar la expresión de las proteínas se realizó un ensayo de inmunofluorescencia, con anticuerpos dirigidos a Kv 11.1 y se encontró, la expresión de las proteínas mutantes en membrana así como del canal nativo. Además para analizar la función se realizaron estudios electrofisiológicos y se encontró que la mutante R1032W, tiene una disminución de la densidad de la corriente al pico cercana al 30% y una disminución del voltaje medio de activación de 8mV ($p=0.01$), mientras que la mutante T337S no presentó cambios electrofisiológicos. Para determinar si los cambios electrofisiológicos provocados por la mutante R1032W, fueron debido a variaciones en la expresión de las proteínas se realizó un western blot y encontramos una disminución en la expresión de las mutantes aunque esta no fue significativa.

La mutación R1032W, causa una disminución en la densidad de la corriente cercana al 30% y un cambio en el voltaje medio de activación con respecto al canal nativo, sugiriéndonos que originaría una disminución de la corriente I_{Kr} , con un alargamiento del potencial de acción y predispone al padecimiento del Síndrome del QT largo. Por su parte la mutante T337S, no produce cambios electrofisiológicos significantes, ni presenta alteraciones en su expresión en membrana, por lo tanto no es un riesgo.

I. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas que forman poros transmembrana en las membranas biológicas (Hille B. 2001). Los cambios en su función, pueden conducir a patologías conocidas como canalopatías.

Estas enfermedades se desarrollan por defectos en los canales iónicos causados por factores genéticos, como las mutaciones en la secuencia codificante del ADN de los canales, o bien por factores adquiridos y que dañan la función del canal (Kim J-B. et al 2014).

El Síndrome del QT largo es una canalopatía que origina un alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma, debido a una prolongación de la fase de repolarización de las células cardíacas y en la cual participan principalmente tres corrientes I_{Kr} , I_{Ks} e I_{K1} (Nerbonne & Kass, 2005).

El SQTl tipo 2 es originado por mutaciones en el gen KCNH2 que codifica para la proteína HERG, la cual origina el componente rápido de la corriente rectificadora tardía y que es participe en la fase 3 del potencial de acción cardíaco humano, a este componente se le conoce como corriente rápida de K^+ o I_{Kr} (Ogielska E.M. 1999; Tseng G-N. et al., 2000; Sanguinetti M. C. et al., 2006,).

La caracterización electrofisiológica de nuevas mutaciones del gen KCNH2 como son la R1032W y la T337S, expresadas en sistemas heterólogos como las células HEK 293, ayuda a comprender los cambios que estas mutaciones provocan en su entorno natural, es decir, en el cardiomiocito.

Por ello, las mutaciones otorgadas por la Fondazione Salvatore Maugeri de Pavia Italia, serán expresadas en células HEK 293 y a través de registro electrofisiológico, buscaremos elucidar los cambios en la corriente que las mutantes presenten.

Además para corroborar la expresión de las proteínas sobre membrana y la presencia de las mismas se realizarán ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo dirigido contra el Kv 11.1 y un ensayo de western blot para verificar que no cambie la expresión celular del canal.

II. ANTECEDENTES

II.I Canales iónicos

Hille en 1977 describió a los canales iónicos como poros acuosos con compuertas cuyos movimientos dependen del campo eléctrico en la membrana celular (Hille B. et al. 1977). Más tarde los canales iónicos fueron descritos como proteínas, las cuales forman poros transmembrana en las membranas biológicas (Hille B. 2001).

La función de estas proteínas es la de regular el paso de iones a través de la membrana celular jugando así un papel central en funciones vitales del cuerpo como el latido del corazón, la secreción de hormonas dentro del flujo sanguíneo y la generación de impulsos eléctricos para la transmisión de información en el sistema nervioso, entre otras funciones (Armstrong C. et al 1998).

Algunos canales iónicos son formados por una sola proteína como el canal de cloro regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), o más comúnmente por el ensamble de diversas subunidades. En este caso cada proteína es codificada por diferentes genes que, mediante mecanismos como el uso de múltiples promotores, de variaciones alternativas de la traducción genética, de modificaciones postraduccionales, de ensamblajes heteroméricos o de la interacción con proteínas accesorias, les brindan distintas características biofísicas.

El proceso de apertura de los canales iónicos, es decir, el mecanismo mediante el cual permiten el paso de iones a través de ellos, es regulado por distintos estímulos; algunos son ligandos que se unen al canal, como neurotransmisores, iones de Ca^{2+} o AMPc; otros son estímulos mecánicos, como el estiramiento de la membrana y cambios eléctricos que provocan variaciones en el voltaje de membrana (Kim J-B. et al 2014). Este último tipo de canales que son abiertos por cambios en el voltaje de membrana pertenecen a un grupo de proteínas que es denominada “superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje” (Hille B. et al 2001).

Los canales dependientes de voltaje, son canales iónicos selectivos y permeables para los iones como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} (Elinder F. et al 2007). Hasta el momento se

ha identificado la secuencia genética que codifica para alrededor de 400 subunidades de dichos canales y de sus variantes alternativas. Cada isoforma de estos canales difieren con respecto a su localización celular y subcelular, a sus mecanismos de apertura, de selectividad iónica, de su modulación por subunidades accesorias y de su rol fisiológico (Subramanyam P. et al 2014).

Las mutaciones en la secuencia del ADN que codifica para los diferentes canales iónicos o bien cambios en su función, conducen a varias enfermedades que en conjunto son conocidas como canalopatías.

II.II Canalopatías y Síndrome del QT largo

Las canalopatías son enfermedades que se desarrollan por defectos en los canales iónicos causados por factores genéticos o adquiridos. Las mutaciones en genes que codifican para canales iónicos, dañan la función del canal y son la causa más común de canalopatías (Kim J-B. et al 2014).

De acuerdo a la distribución de los canales iónicos en el cuerpo humano, las canalopatías implican una amplia variedad de enfermedades como la epilepsia, la migraña, ceguera, sordera, diabetes, hipertensión, arritmias cardíacas, asma, síndrome del intestino irritable o cáncer, entre otras (Kim J-B. et al 2014). Por lo que respecta a las canalopatías cardíacas, estas son responsables de aproximadamente la mitad de las muertes súbitas causadas por arritmias y al menos uno de cada cinco casos de muerte súbita infantil (Behr E. R. et al 2008).

En años recientes, con la contribución de la genética molecular, se ha descrito el substrato molecular de varias enfermedades arritmogénicas como el síndrome del QT largo (SQTL), el síndrome de Brugada (SBr), la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) y la fibrilación auricular familiar (Campuzano O. et al 2010). El primer desorden genético cardíaco identificado fue el SQTL. Este es un desorden cardíaco potencialmente mortal que origina una prolongación de la fase de repolarización de las células cardíacas, en donde están al menos

involucradas tres corrientes, la I_{Kr} , I_{Ks} e I_{K1} (Nerbonne & Kass, 2005). Tiene una incidencia de 1/2000 y se caracteriza por la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma (figura 1) lo cual incrementa el riesgo de padecer arritmias como Torsade des Pointes, muerte súbita o sincope, en pacientes jóvenes con una estructura normal del corazón (Tester D. et al, 2014).

Actualmente el 75% de los desórdenes por SQTL son causados por las mutaciones en los genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A. Las mutaciones que causan pérdida de la función en el gen KCNQ1, causan cerca del 35% de los casos de SQTL, denominado tipo 1, mientras que las mutaciones con pérdida de la función en KCNH2 contribuyen aproximadamente en un 30%, denominándolo SQTL tipo 2 (Figura # 1), por otro lado, las mutaciones en el gen SCN5A que generan una ganancia en la función del canal causan aproximadamente el 10% de los casos y reciben el nombre de SQTL tipo 3 (Tester D. et al, 2005). La mayoría de las mutaciones en estos canales son debido a la sustitución o inserción/delección de un solo nucleótido en la secuencia del gen, codificando así para un nuevo aminoácido.

El SQTL tipo 2 es ocasionado por mutaciones en el gen KCNH2, inicialmente fue catalogado como un trastorno raro y, en efecto, la presencia grave de la enfermedad es esporádica, pero la incidencia de las mutaciones se estima en 1/3000-5000 casos (Ackerman MJ. et al, 1998.). Cerca del 32% de los portadores asintomáticos puede tener un QT corregido por frecuencia cardiaca (QTc) en los límites normales (0.30-0.44 segundos en hombres y 0.30-0.45 segundos en mujeres) y transmitir la enfermedad a un 50% de su descendencia, siendo más susceptibles a desarrollar arritmias malignas comparados con el resto de la población y hasta un 20% puede volverse sintomático (Priori SG. et al, 2004).

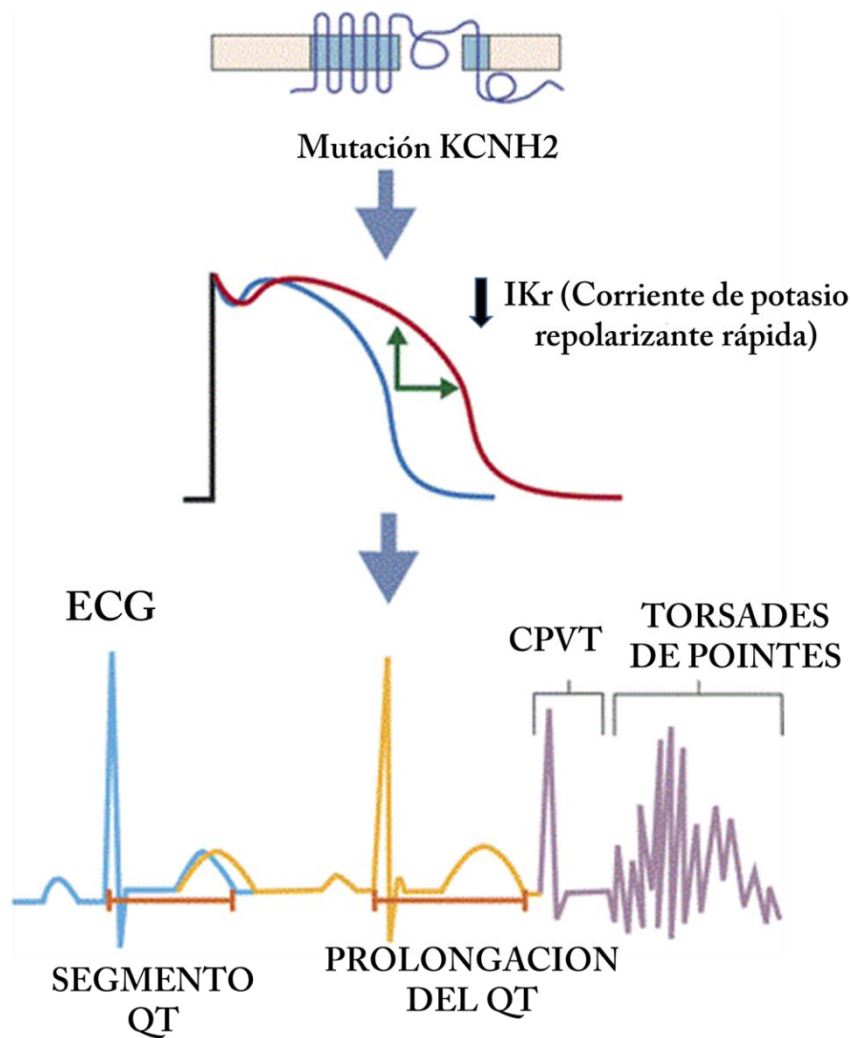


Figura # 1. Síndrome del QT largo tipo 2. Representación de mutaciones en el gen KCNH2 que originan el Síndrome del QT largo tipo 2. Este síndrome origina una prolongación del intervalo QT (trazo amarillo) que puede provocar arritmias como taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) o Torsades de Pointes TdP.

Además de los 3 genes que contribuyen principalmente al origen del SQT, existen por lo menos otros 10 genes susceptibles en la etiología de esta patología: los genes que codifican para subunidades alfa adicionales, CACNAC1C y KCNJ5; los genes para canales de K⁺, AKAP9, KCNE1 y KCNE2; los genes para canales de Na⁺, SCN4B y SNTA1, o aquellos que codifican para proteínas de interacción CAV3 o proteínas mensajeras de unión a calcio CALM1, CALM2. Sin embargo,

estos genes participan con un menor rol en las bases genéticas del SQT (Tester D. et al. 2014) Tabla # 1.

Las mutaciones en genes que codifican para canales iónicos y otros asociados a proteínas han sido identificados en aproximadamente 60-70% de los individuos afectados con SQT y aproximadamente del 50-60% de estos casos, están asociados a mutaciones en genes que codifican para canales de K^+ (Tester D. et al. 2014).

GEN	LOCUS	PROTEINA
GENES CON MAYOR CONTRIBUCIÓN		
KCNQ1 (SQT 1)	11p15.5	I_{Ks} subunidad α del canal de K^+ (KvLQT1,Kv7.1)
KCNH2 (SQT2)	7q35-36	I_{Kr} subunidad α del canal de K^+ (HERG, Kv 11.1)
SCN5A (SQT3)	3p21-p24	Subunidad α del canal de Na^+ cardiaco (Nav 1.5)
GENES CON MENOR CONTRIBUCIÓN		
AKAP9	7q21-q22	Yotiao
CACNA1C	12p13.3	Canal de Ca^{2+} voltaje dependiente tipo L (Cav1.2)
CALM1	14q32.11	Calmodulina
CALM2	2p21	Calmodulina
CAV3	3p25	Caveolina-3
KCNE1	21q22.1	Subunidad β del canal de K^+ (Kv 7.1 ,MinK)
KCNE2	21q22.1	Subunidad β del canal de K^+ (Kv 11.1 ,MiRP1)
KCNJ5	11q24.3	Canal rectificador entrante de K^+ (Kir 3.4)
SCN4B	11q23.3	Subunidad β 4 del canal de Na^+
SNTA	20q11.2	Sintrofina α -1

Tabla #1. Tipos de SQT. El SQT es originado en su mayoría por 3 genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A. Además están presentes otros genes que contribuyen en menor medida en el origen de esta patología. (Tester D. et al. 2014).

II.III Canales de potasio K⁺

Los canales de potasio son un variado grupo de proteínas integrales de membrana que están presentes tanto en células excitables como en no excitables, conducen selectivamente iones K⁺ a una velocidad que va en un rango de 10⁶ a 10⁸ iones/segundo (Snyders D. et al, 1999).

La mayoría de los canales de K⁺ son formados por el coensamble de 4 subunidades α que forman y rodean un poro acuoso y de una subunidad β que funciona como regulador del canal (Snyders D. et al, 1999, Tamargo J. et al., 2004). Cada subunidad α está compuesta a su vez por seis dominios transmembranales que forman un bucle reentrante entre los dominios S5 Y S6 que forma el filtro de selectividad del canal, así mismo cuenta con alta variabilidad de los dominios C y N terminal (Figura #2) (Yellen G. et al., 2002). Las características principales de la subunidad α son: a) el co-ensamble de varias subunidades α forma la región del poro por la cual fluyen los iones K⁺ a través de la membrana plasmática, b) forman un filtro de selectividad que le permite conducir K⁺ pero no otros iones por el poro y c) una vez ensambladas las subunidades α , presentan un mecanismo de apertura o activación y de desactivación o de cerrado que permite al canal estar en un estado conductor o no conductor, determinando así la permeabilidad iónica de acuerdo a los cambios en el potencial de membrana o de su unión a un ligando (MacKinnon R., 2003).

La clasificación general de los canales de K⁺ se basa en la secuencia primaria de aminoácidos que contiene la subunidad del poro. De este modo, las diferentes familias de canales de potasio están agrupadas en tres grupos, en cada uno las subunidades alfa contienen 6, 4 o 2 segmentos transmembranales (Shiem C. et al, 2000; Tamargo et al, 2004):

- Canales de K^+ voltaje dependientes (Shaker like) contienen 6 regiones transmembrana (S1-S6) con un solo poro.
- Canales de K^+ rectificadores entrantes que contienen solo dos regiones transmembrana y un solo poro.
- Canales de K^+ dos poros, contienen 4 regiones transmembrana con dos regiones de poro.

II.IV Canales de K^+ dependientes de voltaje

Los canales de K^+ dependientes de voltaje, son proteínas integrales de membrana que tienen 4 subunidades α y cada una contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6) y un poro de conducción (P), cuenta con un sensor de voltaje distribuido en el segmento S4, en el asa S4-S5 y además en un segmento distal en el extremo carboxilo terminal. El segmento S5-S6 presenta diferentes sitios de unión para toxinas y bloqueadores del canal de K^+ (figura #2) (Snyders D. J. et al., 1999).

El canal de K^+ dependiente de voltaje cuenta con una secuencia tripeptídica G (Y/F) G localizada en la unión del segmento S5-S6, la cual es común para el asa P, por lo tanto ha sido considerada como la secuencia motivo de la selectividad en todos los miembros de la familia de los canales de K^+ (Mackinnon R., 2003; Tamargo J. et al., 2004; Liu et al., 2014,).

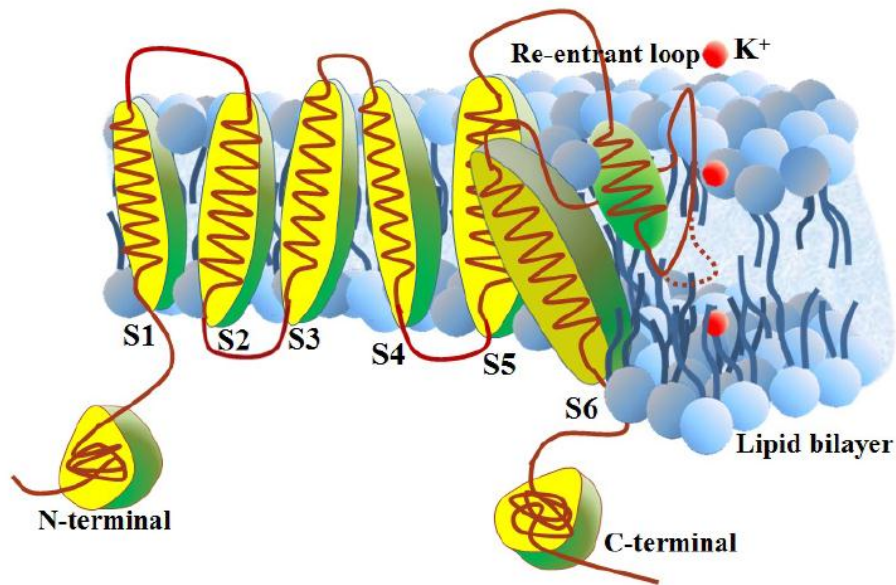


Figura # 2. Estructura general de los canales de K⁺ dependientes de voltaje Kv. Los Kv están formados por 4 subunidades α formando un poro de conducción además de que algunos interactúan con subunidades accesorias o β. (Tomado y modificado de Liu W-X. et al., 2014).

Los canales de potasio dependientes de voltaje generan corrientes salientes en los rangos fisiológicos del potencial de membrana. De hecho, actúan acercando el potencial de reposo al potencial de equilibrio para el ion K⁺ o durante la fase de repolarización del potencial de acción (Snyders D. et al, 1999).

Algunos de estos canales de K⁺ dependientes de voltaje incluyen una subunidad beta auxiliar (Kvβ), la cual es una proteína citoplasmática con un sitio de unión localizado en la región N terminal de la subunidad α. Algunos ejemplos de estos canales son el tipo Shaker, canales de K⁺ relacionados al gen humano éter a go-gó HERG, canales de K⁺ activados por Ca²⁺ y canales KCNQ (Tamargo et al, 2004).

II.V HERG

El gen humano del canal de K^+ relacionado a éter a go-gó, HERG, codifica para la formación de la subunidad α del canal de potasio dependiente de voltaje. Estos canales son referidos como I_{Kr} , HERG o Kv 11.1. De manera más clara, KCNH2 cuando nos referimos al ADN o al ARNm, HERG cuando nos referimos a la proteína, Kv 11.1 cuando nos referimos a todo el ensamblaje para su estudio en sistemas de expresión heterólogo e I_{Kr} cuando hablamos del canal nativo (Vandenberg et al., 2012).

El término de la familia de canales de potasio nombrada “éter a go-gó” fue acuñado por Kaplan y Trout en 1969 y fue un nombre humorístico de como los huevos de las moscas mutantes de *Drosophila*, se movían bajo anestesia con éter como si fueran bailarinas de go-gó de 1960 (Kaplan et al., 1969, Trudeau M. et al., 1995).

KCNH2 fue clonado por primera vez en 1994 por Warmke y Ganetzky, a partir del ADN proveniente del hipocampo de humano. KCNH2 fue localizado en el cromosoma 7 y el análisis de su secuencia reveló que los canales de K^+ dependientes de voltaje de la familia HERG representan una vía intermedia entre los canales de potasio dependientes de voltaje y los canales activados por nucleótidos cíclicos (Warmke & Ganetzky, 1994; Warmke J. et al., 1994).

La proteína HERG origina el componente rápido de la corriente rectificadora tardía que actúa en la fase 3 del potencial de acción cardiaco humano, a este componente se le conoce como corriente rápida de K^+ o I_{Kr} . Las primeras investigaciones realizadas para estudiar la I_{Kr} fueron realizadas por Sanguinetti en 1990, quien usó antiarrítmicos clase III para separar el componente rápido y lento de la corriente rectificadora tardía (Sanguinetti MC et al., 1990). El componente rápido es bloqueado por concentraciones micromolares de La^{3+} y por los antiarrítmicos del grupo de las metanosulfonamidas como E4031, el d-sotalol o el dofetilide (Sanguinetti MC et al., 1990). Más adelante, las bases moleculares de HERG fueron elucidadas cuando este canal fue relacionado a la forma congénita del síndrome de QT largo (Trudeau M. et al., 1995).

II.VI Proteína HERG

El gen humano KCNH2 se expande ~ 33 Kb en el brazo largo del cromosoma 7 en la región 36.1, por splicing alternativo se generan 3 diferentes isoformas de las cuales la más abundante tiene 15 exones, es la de mayor tamaño y se denomina KCNH2-1a, Figura # 3 (Itoh T. et al., 1998, Curran M.E., 1995).

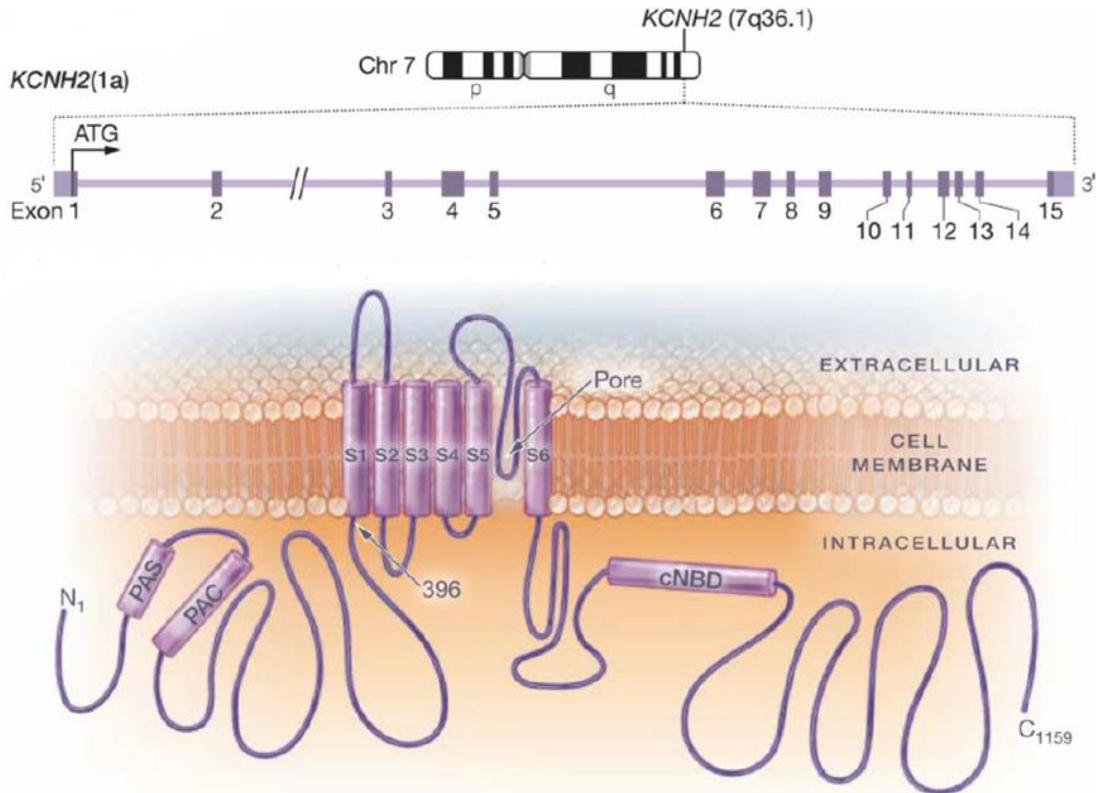


Figura # 3. Estructura de la subunidad α de HERG. Ubicación cromosómica del gen *KCNH2*. Isoforma *KCNH2*-1a. El canal *KCNH2* forma la subunidad α del canal HERG con 6 segmentos transmembrana (S1-S6), dominios NH₃ y COOH terminal intracelulares. (Tomado y modificado de Crotti L. et al., 2013).

El transcripto de KCNH2-1a origina la proteína HERG de 1159 aminoácidos (Warmke J. et al. 1994). El canal funcional, es un tetrámero con cuatro subunidades α revistiendo la vía central, cada subunidad α contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6) donde los segmentos S1-S4 contribuyen al dominio sensor de voltaje y S5-S6 intervienen en la formación del bucle en el poro para la conducción del ion.

Además HERG contiene unos dominios largos citoplasmáticos de NH₂ terminal y COOH- terminal. El COOH- terminal contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos, cNBD, mostrando homología a los canales activados por nucleótidos cíclicos CNG o los canales catiónicos activados por hiperpolarización HCN (Cui J. et al., 2001).

La unión S4-S5 y la parte media del C-terminal en el S6 son importantes componentes de la activación, las mutaciones puntuales en estas regiones tienen marcados efectos sobre la cinética de activación e inactivación y la dependencia de voltaje (Tamargo J. et al., 2004).

El canal HERG contiene un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) sobre la parte citoplasmática del N-terminal, la cual puede interactuar con otras regiones de HERG como la unión S4-S5 y afectar la desactivación del canal (Gianulis E.C. et al., 2011).

El coensamble de varias subunidades α forma canales heterotetraméricos. Sin embargo I_{Kr} y los canales expresados en sistemas heterólogos son diferentes en cinética así como en la regulación por K^+ extracelular y en la conductancia del canal unitario (Tseng G-N. et al., 2000). Estas diferencias sugieren la presencia de subunidades moduladoras que, coensambladas con HERG, modulan la cinética del canal nativo. Uno de los genes propuestos es el gen KCNE2 el cual codifica para MiRP1 debido a que, cuando son coexpresados la curva de activación cambia en dirección positiva, acelerando la desactivación y disminuyendo la conductancia del canal (de 13 a 8 pS) además de que regula los efectos

estimuladorios de AMPc sobre los canales HERG/KCNE2 asemejando el funcionamiento del canal nativo (Tamargo J. 2004).

En genomas de vertebrados existe una correlación importante entre los exones y los dominios codificantes para la proteína. El caso del gen KCNH2 es dado por las siguientes correlaciones en la cual, el exón 1 codifica para la región no traducida 5'UTR y los primeros 26 residuos aminoacídicos juegan un rol importante en la regulación de la desactivación en la cinética del canal. Se ha encontrado que el exón 6 codifica la última porción del NH₂ terminal y los primeros tres segmentos transmembranales. El exón 7 codifica los cuatro segmentos transmembrana y el segmento que contiene las cargas positivas que actúan como principal sensor de voltaje dentro del dominio sensor de voltaje (Jiang Y. et al., 2002, Liu M. et al., 2004).

II.VII Génesis y tráfico del canal Kv 11.1

Defectos en la biogénesis del canal Kv 11.1 pueden ocurrir a nivel del procesamiento para la estabilidad del ARNm, o plegamiento y movimiento de proteínas.

Al igual que otras proteínas destinadas a la membrana plasmática, el ARNm del KCNH2 es procesado en el núcleo, alcanza el citosol donde es unido a los ribosomas para dar inicio a la traducción. Una vez traducido, la secuencia señal transmembrana es reconocida y el complejo polipeptido-ARN-Ribosoma es translocado a través de la membrana del retículo endoplásmico (Gong Q. et al, 2005).

Una vez en el retículo, con ayuda de las chaperonas Hsp /c70 and Hsp90, las cadenas nascentes de polipeptidos se pliegan y ensamblan en tetrámeros antes de ser exportados al aparato de Golgi donde los canales sufren glicosilaciones antes de ser enviados a la membrana plasmática (Gong Q. et al., 2002; Ficker E. et al, 2003). En condiciones normales podemos encontrar a la proteína inmadura, glucosilada solo en la parte central del poro y con un peso molecular de 135 KDa. El canal ya maduro pesa alrededor de 155KDa, es una proteína glucosilada que

es transportada a la membrana celular donde permanece, con una vida media de ~ 10 horas.

II.VIII Degradación de ARNm y Proteínas

La degradación de la proteína es llevada a cabo por dos procesos bien conocidos, degradación proteosomal-poliubiquitinación como también degradación lisosomal por ubiquitinación (Gong Q. et al., 2005).

En la degradación de HERG, los canales maduros tetramericos son internalizados en vesículas endocíticas y son blanco de degradación lisosomal por ubiquitinación (Gong Q. et al, 2005).

Además la degradación de las proteínas maduras, cualquier subunidad de la proteína madura que no esté correctamente plegada, permanece asociada con chaperonas y es blanco de CHIP (proteína de interacción con el COOH terminal-HsC70) para la degradación y transferidas al proteosoma (Gong Q. et al, 2005; Walker V.E. et al., 2010).

Los canales mutados, con mal plegamiento no pueden formar canales tetramericos activos, estos son retenidos en el retículo endoplásmico y destruidos por degradación proteosomal asociada a retículo endoplásmico (Walker V.E. et al., 2010). La degradación prematura del ARNm se origina principalmente por mutaciones del gen KCNH2. Los codones de terminación prematura son originados por mutaciones sin sentido o por desplazamiento del marco de traducción (Thermann R. et al.,1998; Zhang J. et al.,1998).

II.IX Isoformas de KCNH2

Al menos tres sitios alternativos para el inicio de la transcripción para KCNH2 han sido descritos. Estos transcritos codifican para KCNH2-1a que es el transcritto predominante en corazón, KCNH2-1b, también expresado en corazón pero en una

cantidad mínima respecto a la isoforma KCNH2-1a y KCNH2-3.1 mayormente expresado en tejido neuronal (Gong Q. et al., 2010).

La isoforma de KCNH2-1a contiene 15 exones, KCNH2-1b carece de los primeros 5 exones de KCNH2-1a pero contiene al final 10 exones de largo con un exón adicional 1b. KCNH2-3.1 carece del exón 1 y 2 y tiene un extenso exón 3 (al final del 5') originando un total de 13 exones.

II.X Canales Kv 11.1

Kv 11.1 puede presentar tres estados, abierto, cerrado e inactivo, pero la parte distintiva del canal es por un lado el proceso de inactivación de Kv 11.1, que es mucho más rápido en comparación con la cinética de activación, lo que reduce la corriente saliente a potenciales despolarizados y alarga la fase 2 del potencial de acción.

Por otro lado, la recuperación de la inactivación es mucho más rápida que el proceso de desactivación, lo que le permite iniciar la fase 3 del potencial de acción. Todos estos procesos son dependientes de voltaje (Wang S. et al., 1997; Sanguinetti et al., 2006).

La corriente I_{Kr} es caracterizada por una activación a valores umbrales de -40 a -30 mV, alcanza el pico máximo de corriente a +20mV (Horie M. et al. 1990; Sanguinetti et al., 1990; Trudeau MC. et al.1995) y cuenta con una rápida inactivación y una fuerte rectificación entrante a potenciales positivos, los cuales son debido a la dependencia de voltaje e inactivación tipo C (Wang S. et al., 1997; Rasmusson R. et al., 1998) Figura # 4.

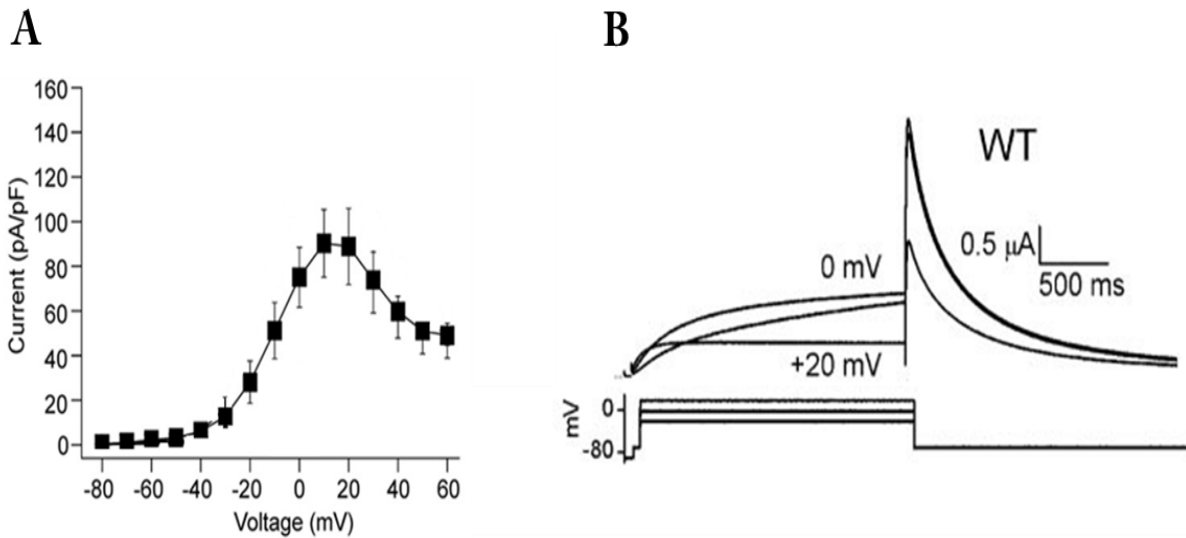


Figura # 4. Curva corriente vs voltaje I-V de la I_{Kr} . A) Se observa la típica forma en campana de la corriente I_{Kr} . B) Corrientes iónicas expresadas en ovocitos del canal HERG WT evocadas por pulsos despolarizantes (Tomado de Piper D. et al 2005).

En el rango repolarizante del potencial de acción, la recuperación de la inactivación al estado abierto es mucho más rápida que la desactivación, lo cual a voltajes negativos resulta en una larga corriente saliente promoviendo la fase 3 de la repolarización cardíaca (Tseng G-N. et al., 2000; Sanguinetti M. C. et al., 2006). Así I_{Kr} juega un rol importante en la regulación de la duración del potencial de acción cardíaco y su periodo refractario, Figura # 7.

II.XI Potencial de acción cardíaco

El potencial de acción es el mecanismo básico mediante el cual se logra la transmisión electroquímica de la información entre un sistema y otro; en el caso del músculo cardíaco, la morfología del potencial de acción varía en las diferentes zonas del corazón debido a la expresión diferencial de canales iónicos con

propiedades diversas. Esto, aunado al acople eléctrico entre las células cardíacas, permite la propagación unidireccional de la onda de excitación que desencadena la contracción y la función de bomba del corazón (Dobrzynski H. et al., 2013).

La generación del potencial de acción en células de trabajo o miocárdicas refleja la activación e inactivación secuencial de canales que conducen a la despolarización de la célula, canales de Na^+ y Ca^{2+} y posteriormente a su repolarización con corrientes principalmente de K^+ (Nerbonne J. et al., 2005., Grant A. et al., 2009., Schmitt N. et al., 2014) Figura # 5.

Para su estudio el potencial de acción cardíaco se puede dividir en 4 fases que son descritas de la siguiente manera:

- Fase 4 o de potencial de reposo, donde las células miocárdicas de trabajo mantienen un potencial de aproximadamente -90 mV .
- Fase 0, de ascenso del potencial de acción o de despolarización rápida. Resulta de la activación de canales de sodio voltaje dependientes, Nav ; esta fase origina una rápida propagación del impulso cardíaco con una velocidad de conducción $\theta = 1 \text{ m/s}$.
- Fase 1 o de repolarización rápida, durante esta fase se da una repolarización transitoria que se origina al inactivarse los canales de Na^+ y por la activación de una corriente transitoria de potasio dependiente de voltaje o I_{t0} . Esta repolarización transitoria puede ser prominente en células ventriculares y de Purkinje.
- Fase 2 o de meseta; durante la despolarización de la membrana también son activados canales de calcio activados por voltaje, Cav . Debido a la lenta cinética de apertura es estos canales, es en esta fase cuando más calcio entra a la célula y junto con la corriente de potasio I_{Ks} , son los responsables de esta fase.
- Fase 3 o de repolarización lenta durante la cual predominan corrientes salientes de potasio, que regresan el voltaje al potencial de reposo de la membrana. A diferencia de las otras fases donde es más preponderante una sola corriente en esta fase, se encuentran involucradas distintas

corrientes de potasio dependientes de voltaje que contribuyen a la repolarización del potencial de acción cardiaco.

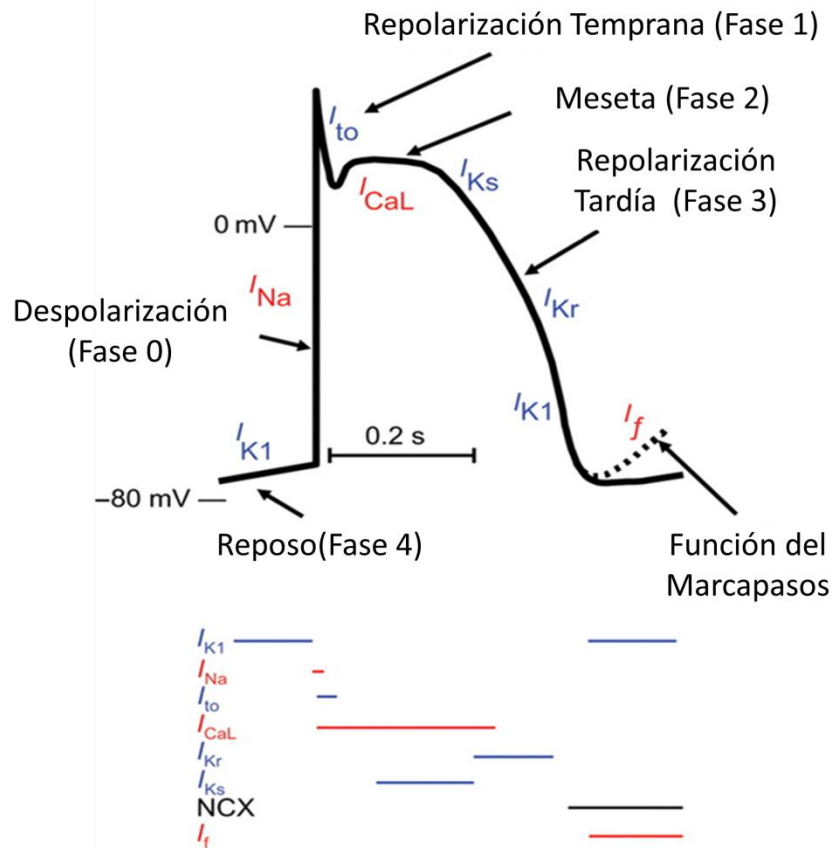


Figura # 5. Potencial de acción cardiaco. Fases del potencial de acción cardiaco, en la parte inferior, observamos con líneas horizontales la duración aproximada de las corrientes participantes en el potencial de acción cardiaco.

II.XII Corrientes repolarizantes del potencial de acción cardiaco

Dos amplias clases de corrientes repolarizantes han sido distinguidas (Xu H. et al., 1999, Nerbonne J. et al., 2005): corrientes transitorias salientes como I_{to} y rectificadores tardíos I_K (Figura # 6). Las corrientes transitorias se activan e inactivan rápido, desde potenciales despolarizantes de aproximadamente -30mV y marcan la fase 1 del potencial de acción, en cambio los rectificadores tardíos se activan a potenciales de membrana similares pero cuentan con una cinética distinta, sobre todo un proceso de activación más lento. Estas corrientes portan el voltaje de membrana durante el potencial de acción a los valores de potencial diastólico (Nerbonne J. et al., 2005).

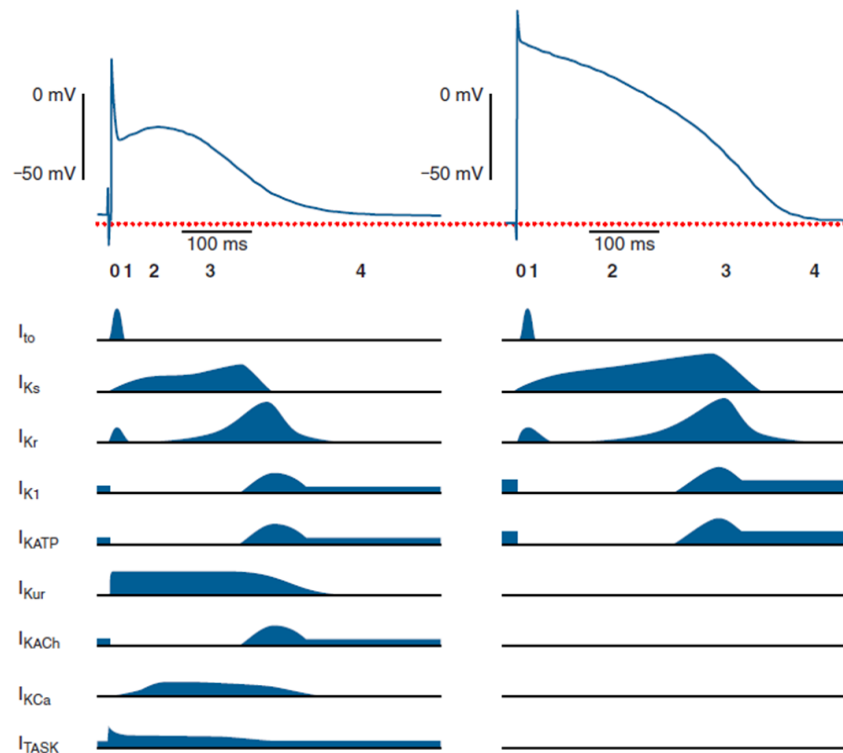


Figura # 6. Potencial de acción cardiaco y corrientes repolarizantes. Del lado Izquierdo tenemos un potencial de acción auricular (trabécula) y las principales corrientes repolarizantes. Del lado derecho observamos un potencial de acción ventricular (septum) con las corrientes repolarizantes participantes. (Tomado de Schmitt N. et al., 2014).

Las diferencias en densidad de corriente y sus propiedades biofísicas contribuyen a la variación en la morfología del potencial de acción en diferentes tipos de células cardiacas y también en distintas especies.

Por ejemplo en miocitos de ratón adulto se han descrito dos corrientes transitorias salientes, denominadas $I_{to,fast}$ y $I_{to,slow}$. En humanos $I_{to,fast}$ marca la fase 1 o temprana de repolarización en células ventriculares y auriculares.

Por otro lado los rectificadores tardíos I_K , fueron primeramente descritos por Noble y Tsien en 1969 y son los responsables de la fase de repolarización tardía del potencial de acción, además de modificar la duración del potencial de acción en algunas especies (Stanley N. et al., 2008). Los rectificadores tardíos son compuestos por I_{Kr} , I_{Ks} e I_{K1} .

El componente rápido de la repolarización I_{Kr} contribuye a la fase 3 del potencial de acción cardiaco, es formado por el ensamble de 4 subunidades α codificados por el gen KCNH2. La corriente I_{Kr} abre a potenciales despolarizantes de -40mV y alcanza el pico máximo de corriente a +20mV (Sanguinetti et al., 1990; Trudeau MC. et al.1995) su cinética es de rápida inactivación y una fuerte rectificación a potenciales positivos (Wang S. et al., 1997; Rasmusson R. et al., 1998).

I_{Ks} es formada por el ensamble de la subunidad α codificada por el gen KCNQ1, también es una corriente dependiente de voltaje que abre a potenciales despolarizantes de -20mV y tiene una cinética de activación lenta, además su actividad lenta es causada por la presencia de una subunidad β denominada KCNE1. Este canal contribuye en la fase 2 del potencial de acción y llega a ser la llave para la conducción de potasio en la fase 3 (Nerbonne J.et al., 2005; Stanley N. et al., 2008).

I_{K1} no cuenta con un sensor de voltaje pero los canales Kir 2.X son indirectamente sensibles al voltaje debido al flujo de salida del ion K^+ acompañado del ion Mg^{2+} y poliaminas tales como espermina que bloquean el canal en potenciales positivos. Cuando el potencial de membrana se encuentra en valores positivos el flujo a través de este canal es inhibido, es decir en la fase 1-2. Mientras que en la fase 3

cuando se da el proceso de repolarización, el bloqueo que fue dado por Mg^{2+} y poliaminas es liberado pudiendo así I_{K1} contribuir a la repolarización cardiaca (Xu H. et al., 1999; Schmitt N. et al., 2014).

Las propiedades únicas tiempo y voltaje dependencia de I_{kr} e I_{ks} sugieren que estas corrientes juegan un rol preponderante en la repolarización del potencial de acción, particularmente en miocitos ventriculares y fibras de Purkinje

II.XIII Rol fisiológico de HERG

Los canales Kv 11.1 son expresados ampliamente en una variedad de tejidos pero su rol fisiológico es mejor caracterizado en células cardiacas. La cinética de sus estados conductores, le otorgan las propiedades rectificantes salientes y un papel preponderante en la repolarización cardiaca (Ogielska E.M. 1999; Tseng G-N. et al., 2000; Sanguinetti M. C. et al., 2006,) Figura # 7.

La lenta activación de la corriente I_{kr} y su rápida inactivación es determinante de la fase de meseta del potencial de acción en miocitos ventriculares y auriculares, alargando la fase de meseta y aumentando el tiempo para la entrada de calcio necesario para el acople excitación-contracción en la célula cardiaca normal (Sanguinetti M. 1995; Sanguinetti M. et al., 2006; Schimpf R. et al., 2008).

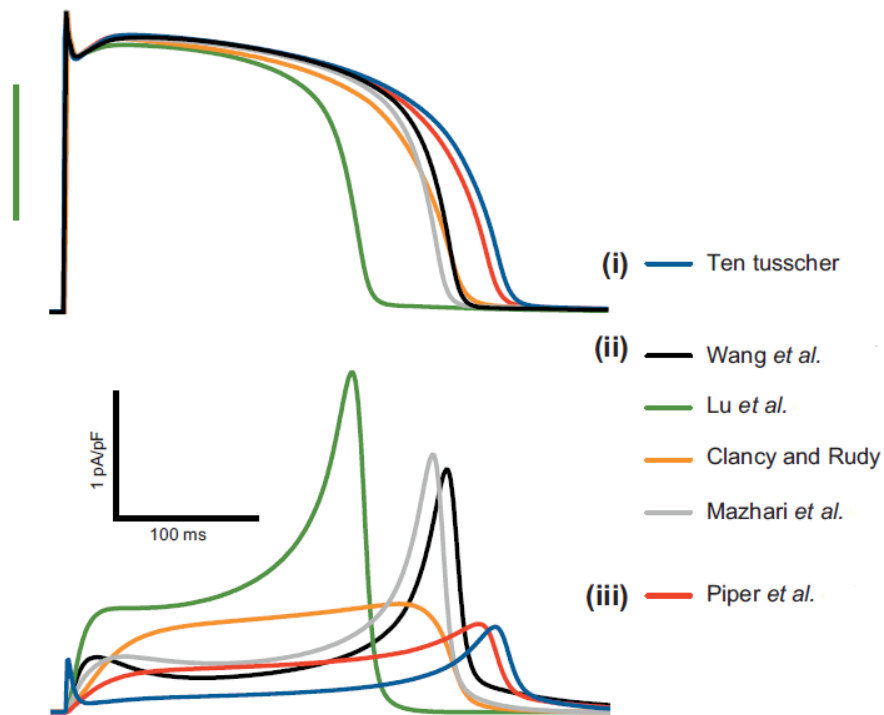


Figura #7. Potencial de acción y corrientes originadas por Kv 11.1 usando diferentes modelos de apertura. Estos modelos indican cómo cambia la morfología del potencial de acción en la fase de repolarización debido a la corriente originada por el Kv. 11.1, los modelos fueron realizados por autores independientes. (Tomado de Vandenberg et al., 2012).

Cuando inicia la repolarización, el canal I_{Kr} se recupera de la inactivación mucho más rápido de lo que se desactiva, permitiendo que haya más canales en estado abierto y se genere una corriente que acelera la repolarización, debido a la gran conductancia de K^+ cuando el canal se recupera de la inactivación (Sanguinetti M. et al., 1995). Esta retroalimentación positiva asegura que la repolarización sea rápida y robusta. (Sanguinetti M. et al., 2006). Durante el inicio de la fase 4 del potencial de acción, una parte de los canales de Kv11.1 estará aún abierta debido a la lenta desactivación, contribuyendo al periodo refractario relativo de las células cardíacas y a evitar despolarizaciones tempranas (Lu Yu. et al., 2001; Smith PL. et al., 2002; Schmitt N. et al., 2014).

III. PLANTEAMIENTO ***DEL PROBLEMA***

La muerte súbita es la mayor causa directa de defunciones en países industrializados sin embargo, la razón de la muerte de un número significativo de personas que presentaron muerte súbita aún permanece sin explicación. Estos casos son referidos como muerte “natural” o arritmogénica (Go AS., et al .2014). En personas jóvenes, más del 50% de los casos de muerte súbita son causados por paro cardíaco ya que la muerte súbita es la primera y la única manifestación clínica de una enfermedad cardíaca no adquirida que permanece sin detectar por las investigaciones clínicas convencionales. Un método alternativo de detección es el tamizaje genético el cual recientemente ha sido agregado a las pruebas clínicas (Kapplinger JD. et al., 2009). Por sí solo, el análisis genético no determina si una persona padece o no una enfermedad, pero si ayuda a identificar portadores dentro de una familia o en la población en general además de establecer medidas de prevención acordes con el cuadro clínico esperado.

Diversas mutaciones en genes que codifican para canales iónicos cardíacos y proteínas estructurales han sido asociadas con arritmias fatales y no fatales, a través de mecanismos básicos que aún no han sido elucidados (Campuzano O. et al., 2010). Se ha descrito que las mutaciones en canales iónicos de Na⁺, K⁺, y Ca²⁺, expresados en el corazón afectan la morfología o generación del potencial de acción o la homeostasis del calcio (Campuzano O. et al., 2010; Kim J-B. et al., 2014). Las canalopatías cardíacas pueden ser identificadas solo por la presencia de algunas anomalías características en el electrocardiograma, con pruebas de esfuerzo o mediante un test genético con el posterior análisis de la mutación, a nivel electrofisiológico como molecular.

Por lo tanto, caracterizar mutaciones nuevas, ayuda a entender la fisiopatología de algunas enfermedades como es el Síndrome del QT largo, además de otorgarle un tratamiento y una mayor esperanza de vida al paciente.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los cambios funcionales que producen las mutaciones R1032W y T337S en el gen KCNH2 codificante para el canal de potasio HERG?

V. HIPOTESIS

Las mutaciones R1032W y T337S en el gen KCNH2 codificante para el canal de potasio HERG, provocan un mal funcionamiento del canal de potasio.

VI. OBJETIVOS

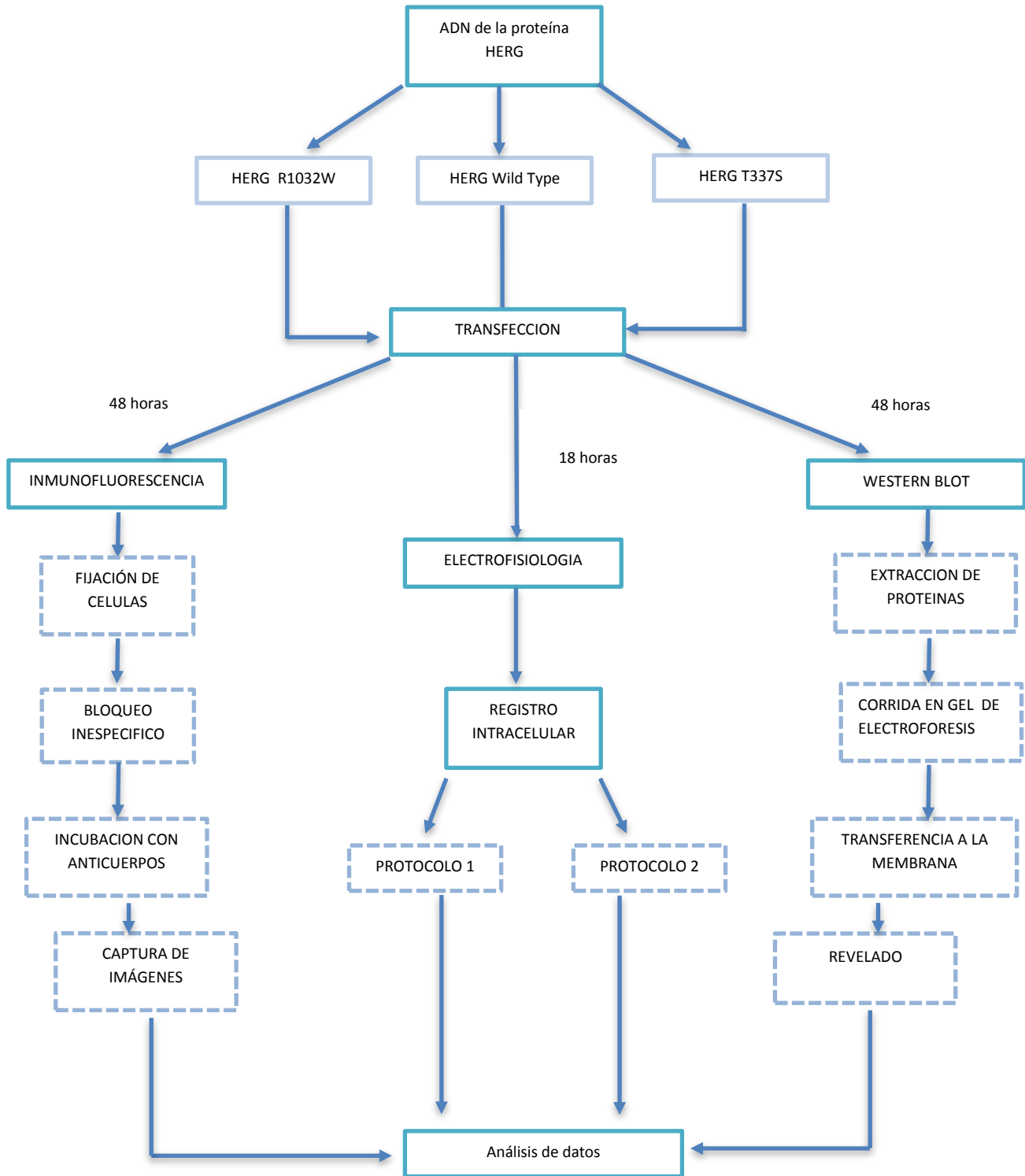
VI.I Objetivo general

Demostrar si las mutaciones T337S y R1032W en el canal HERG alteran el funcionamiento del canal de potasio.

VI.II Objetivo específico

- 1) Expresar la forma nativa del canal de potasio HERG, así como las mutantes HERG R1032W y HERG-T337S en la línea celular HEK 293.
- 2) Demostrar por inmunofluorescencia la expresión del canal Wild Type, HERG-WT y las mutantes HERG-R1032W y HERG-T337S en la membrana de las células HEK-293.
- 3) Demostrar mediante la técnica de patch clamp si los canales de potasio HERG y sus mutantes HERG R1032W y HERG T337S son funcionales en la línea celular HEK-293.
- 4) Demostrar mediante la técnica de western blot si existe un cambio en la expresión de las proteínas mutantes con respecto a la WT.

VII. DIAGRAMA DE TRABAJO:



VIII. METODOLOGÍA

VIII.1 ADN del canal de potasio HERG

El ADNc que utilizamos para la expresión del canal nos fue otorgado para la caracterización electrofisiológica por el laboratorio de Cardiología Molecolare de la Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia, en Italia, a cargo de la profesora Silvia Priori. Este laboratorio cuenta con uno de los más extensos bancos de datos sobre mutaciones que originan arritmias cardiacas y la información se puede encontrar en el sitio web de la Fundación (www.triad.fsm.it/cardmoc/) o bien contactando directamente a los responsables.

El primer ADNc HERG R1032W, pertenece a un paciente de origen asiático, el cual acude a la clínica por antecedentes familiares de muerte súbita. Cuando se le realiza prueba de esfuerzo no presenta alteración en el electrocardiograma,

Sin embargo durante el tamizaje se encontró la mutación en el canal de K⁺ HERG, en el aminoácido 1032 (Figura #8), el cual cambia de una Arginina a un Triptófano, además de que presento mutación en el canal RyR.

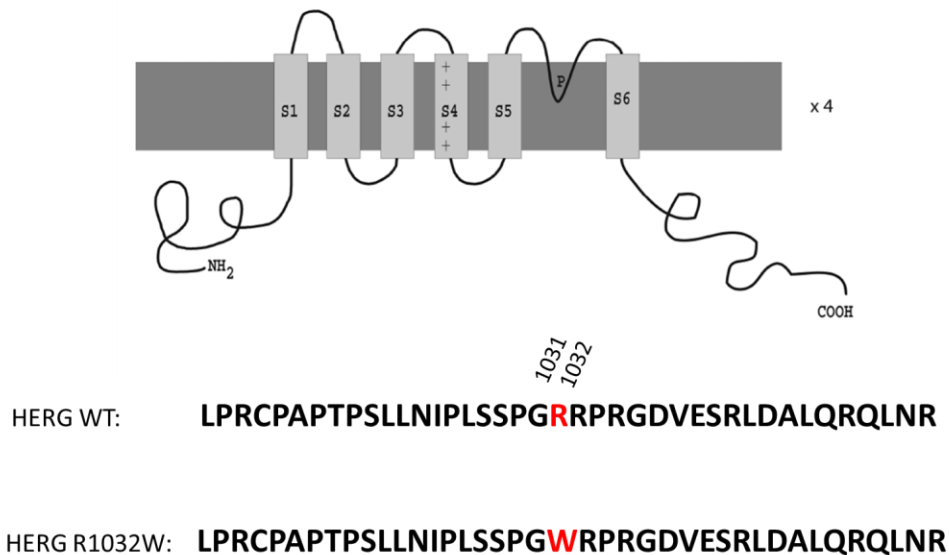
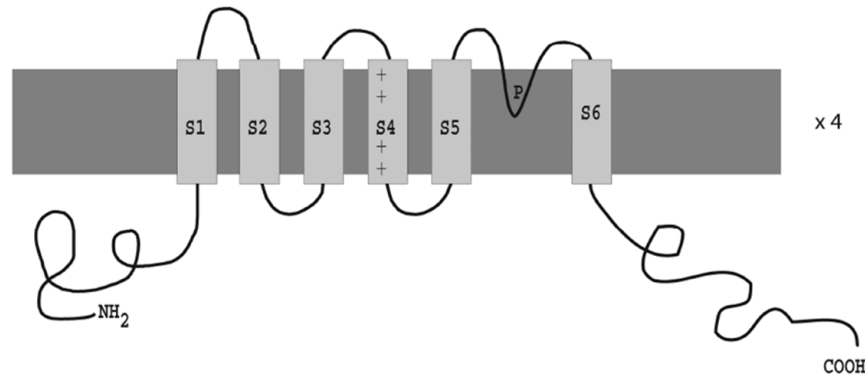


Figura # 8. Mutación R1032W en el canal de potasio dependiente de voltaje HERG. La mutación se da en el aminoácido 1032 el cual cambia de una Arginina (R) por un Triptófano (W).

La otra mutación, HERG T337S, es obtenida de un segundo paciente de origen italiano, que acude a clínica por antecedentes familiares de muerte súbita, su hermano fallece por Síndrome de Brugada, cuando se realiza prueba de esfuerzo al paciente, no se observan anomalías en el electrocardiograma pero durante el tamizaje se detecta la mutación HERG T337S en la cual, el aminoácido en la posición 337 cambia de una Treonina a una Serina (Figura # 9).



³³⁶
³³⁷

HERG WT: **NSTSDSDLVRYRTISKIPQITLNFVDLKGDPFLASPTSDRE**

HERG T337S: **NSTSDSDLVRYRTISKIPQISLNFVDLKGDPFLASPTSDRE**

Figura # 9. Mutación T337S en el canal de potasio dependiente de voltaje HERG. La mutación se origina en el aminoácido 337 el cual cambia de una Treonina (T) por un Serina (S).

VIII.II Cultivo y mantenimiento de la línea celular Human Embryonic Kidney HEK 293A

Las células HEK-293 ATCC N° CRL-1573 (del inglés Human Embryonic Kidney cells) son una línea celular que deriva de epitelio de riñón humano, son células adherentes y crecen en monocapa. Estas células contienen el ADN de adenovirus tipo 5 lo cual les permite producir altos niveles de proteínas.

Para el mantenimiento de estas células el cultivo se mantuvo con Medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM, con alta concentración de glucosa, y adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal SBF, 2 mM de glutamina y 1% de penicilina (DMEM-SBF 10%). El cultivo se mantuvo en una incubadora húmeda a 37° C con una atmosfera saturada al 5% de CO₂. Para conservarlas en buen estado las células se mantuvieron en una confluencia entre el 40 y el 70% y fueron divididas y resembradas cada 3-4 días, dependiendo del tipo de experimento que se fuera a realizar.

VIII.III Transfección

La transfección es el proceso por el cual los ácidos nucleicos son introducidos dentro de células de mamíferos. La transfección en células HEK con el DNA del canal HERG fue realizada con el kit de transfección Effectene de la marca Qiagen, el cual se basa en una formulación lipídica no liposómica que garantiza una tasa de transfección superior al 70% en una amplia variedad de líneas celulares, además de ofrecer una mínima toxicidad y la posibilidad de ser usado en presencia de suero.

Para que el procedimiento de transfección sea efectivo primero se debe precipitar al DNA, una vez que haya formado pequeños complejos, entonces se procede a empaquetarlo en pequeñas micelas lipídicas para poder introducirlo dentro de las células. Esto se logra utilizando en primera instancia el buffer de condensación y la solución potenciadora y posteriormente el reactivo effectene. Este último

reactivo formará micelas de tamaño constante con dentro el DNA, las cuales dadas sus propiedades hidrofobicas, atravesaran libremente la membrana plasmática hasta llegar al núcleo celular. Las transfección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y solo se ajustó la cantidad de DNA usado. El procedimiento fue el siguiente:

Un día antes de la transfeccion las células HEK fueron divididas y sembradas en cajas Petri de 60 mm a una confluencia del 30% y mantenidas con medio DMEM-SFB 10% a 37° C en la incubadora hasta el momento de la transfección, 24 horas después. Justo antes de la transfección el medio de cultivo fue recambiado por 4 ml de medio fresco para posteriormente agregar el DNA, del canal de interés, previamente preparado para transfectar (Ver tabla 2). Después, las células se mantuvieron en cultivo durante 6 horas para finalmente recambiar el DMEM-SFB 10% por medio fresco.

	ADN HERG µg	ADN GFP ug	Buffer TE µl	Enhancer µl	Effectene µl	DMEM ml
HERG WILD TYPE	1	0.5	125	8	10	1
HERG R1O32W	1	0.5	125	8	10	1
HERG T337S	1	0.5	125	8	10	1

Tabla # 2. Cantidad de reactivos utilizados para la transfeccion del ADN a la línea celular HEK. Las concentraciones se expresan en microgramos (µg) y microlitros µl.

VIII.IV Western Blot

El western blot es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas que permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad del Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epitopo único de la proteína de interés. Esta técnica consta de las siguientes fases: obtención y cuantificación de proteínas, electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección.

VIII.V Obtención de proteínas

Las células HEK fueron transfectadas con el canal HERG-WT, HERG-R1032W y HERG-T337S como se describió previamente pero omitiendo la co-transfección del gen reportero. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron recolectadas para la detección de la canal de potasio Kv 11.1 codificado por el gen KCNH2.

Para la obtención de las proteínas, la caja petri fue lavada previamente con solución amortiguadora de fosfatos o PBS, para eliminar los restos celulares, el suero fetal bovino y el colorante presente en el medio que puede modificar la cuantificación de las proteínas.

Para la caja petri de 60 mm las células fueron lisadas en un total 300µl de buffer RIPA, o buffer de lisis, suplementado con un inhibidor de proteasas 1X. Primero se le colocó 150µl de la mezcla y se raspo la caja petri con ayuda del scraper de tal manera que la mayoría de las células pudieran despegarse, se recogió la suspensión celular en un tubo eppendorf de 500µl y después agregamos los 150µl restantes a la petri, para recuperar la mayor cantidad de células. Después, las células se sonicaron durante 5 segundos y fueron centrifugadas a 10000g por 10 minutos. Finalmente el sobrenadante fue recuperado en una nueva eppendorf

para la cuantificación de proteínas. Todo el procedimiento se realizó a 4°C para minimizar la degradación de las proteínas.

VIII.VI Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la proteína usamos el método del ácido bicinoninico o BCA. Este ensayo se utiliza para la detección y cuantificación de proteínas totales y es basado en la reacción de Biuret, que es producida por péptidos y proteínas pero no por los aminoácidos. Esto se debe a la presencia del enlace peptídico CO-NH-.

El reactivo de Biuret contiene CuSO₄ en una solución acuosa alcalina de NaOH o KOH. La reacción se basa en la formación de un compuesto color violeta debido a la formación de un complejo coordinado entre los iones Cu²⁺ y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando una fuerte absorbancia a 562nm.

La concentración de proteínas generalmente es determinada y reportada con referencia a una proteína estándar como la albumina de suero de bovino. Tomando una serie de diluciones de concentración conocida, se realiza una curva estándar en la cual se gráfica, en el eje X la concentración de proteínas y en el eje de la Y la absorbancia que es originada por la luz absorbida por la solución que ha sido formada.

La relación entre la absorción de luz por una solución diluida o por un gas y la concentración de la fase absorbente es originada por la Ley de Lambert- Beer.

$$A = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde I₀ representa la intensidad de la luz incidente e I la intensidad de luz que atraviesa la muestra.

También se puede expresar la absorbancia en función de la longitud de la muestra y de la concentración del soluto (ε.c.l). La relación de una solución es directamente proporcional a su concentración (c), a mayor número de moléculas,

mayor interacción de luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución (l), a igual concentración, cuan mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas absorben energía; y por ultimo depende de (ϵ), una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromoforo.

Para la determinación de proteínas se utilizó el kit de cuantificación de proteínas Pierce BCA protein assay de THERMO SCIENTIFIC. Para cuantificar las proteínas realizamos el siguiente procedimiento:

a) Preparamos una solución de trabajo mezclando 50 partes del reactivo A por una del reactivo B.

b) En la primera fila de una placa multipozos de 96 coloqué diferentes concentraciones de Albumina que iban de 0 a 20 mg/ml de proteína, 190 μ l de la solución de trabajo y en cada pozo el volumen final de solución fue ajustado a 200 μ l con H₂O estéril.

c) En la segunda fila de la placa multipozos coloqué una dilución 1:100 de las muestras que deseaba cuantificar. (Ver esquema inferior). Cada una de las muestras fue preparada con 190 μ l de la dilución de trabajo, 2 μ l de la solución de proteínas a cuantificar y llevada a 200 μ l con agua estéril de manera doble par cada muestra, esto con la finalidad de corroborar la cuantificación.

Para curva estándar de albumina:

H ₂ O μ l	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
BSA, Albumina 2mg/ μ l	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA protein assay 50:1 A:B μ l	190									
Volumen Final μ l	200									

Para curva de nuestras proteínas de interés:

Proteínas	HERG WT		HERG R1032W		HERG R337S		HEK SIN TRANSFECTAR	
H ₂ O µl	8	8	8	8	8	8	8	8
Proteínas µl	2	2	2	2	2	2	2	2
BSA protein assay 50:1 A:B µl	190							
Volumen Final µl	200							

Después de la preparación de las muestras en el microplato, éste fue incubado a 37 °C por 10 minutos para que ocurriera la reacción de Biuret, después se cuantificó la absorbancia a 562 nm con un espectrofotómetro. La absorbancia de la muestras de albumina fue graficada en función de su concentración, posteriormente se realizó un ajuste lineal de los datos y usando la ecuación de la recta ($y = mx$, donde “y” es la absorbancia, “m” el valor de la pendiente obtenido del ajuste y “x” la concentración de proteínas) se calculó la concentración de cada una de las muestras usando el valor de absorbancia como valor conocido y la concentración como incógnita.

Curva de estandarización

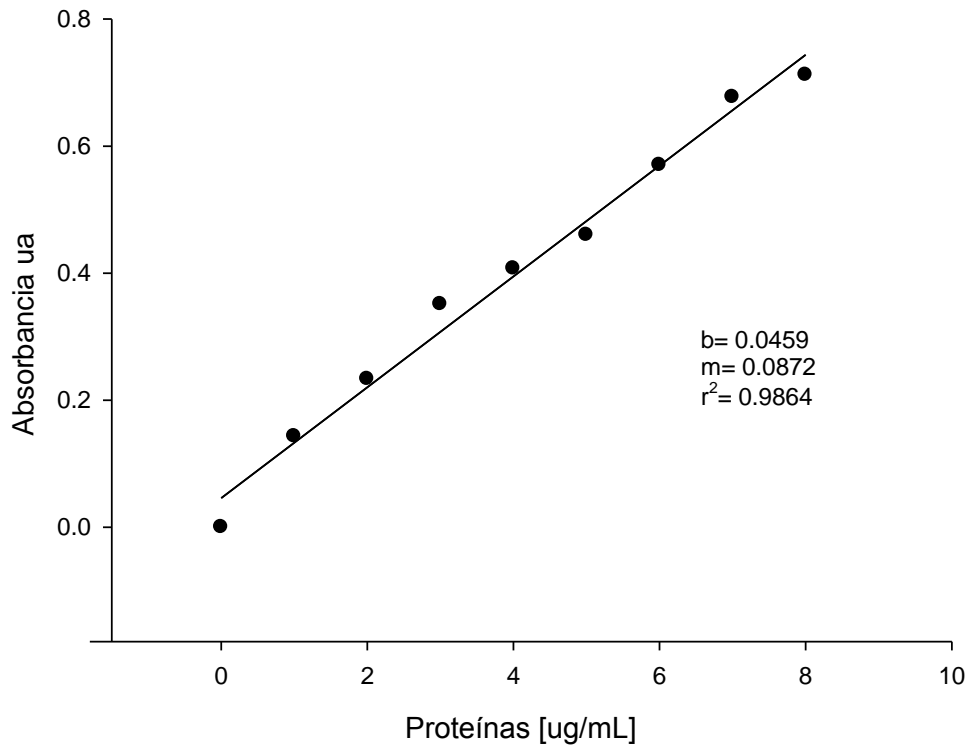


Figura # 10. Curva de estandarización de proteínas. En el eje de las X tenemos la concentración de proteínas en [$\mu\text{g/mL}$], mientras que en el eje de las Y tenemos valores de absorbancia.

VIII.VII Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico. Los solutos migran hacia el cátodo o ánodo en dependencia de su carga, peso molecular y estructura dimensional. Sirve como un método de separación de ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas.

La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se estén moviendo.

El gel de poliacrilamida posee una serie de ventajas tales como: ser químicamente inerte, estable en un rango amplio de pH, temperatura, fuerza iónica y fácil de generar mediante la polimerización de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular, separando a las moléculas por tamaño y permitiendo a las moléculas más pequeñas moverse libremente.

El entramado de los geles de poliacrilamida se origina a partir de la polimerización de la misma, de tal manera que se generan geles con tamaño de poro determinado tanto por la concentración total, como por la concentración relativa de acrilamida y bis-acrilamida; así geles con porcentaje alto en acrilamida 10-15% del total son óptimos para la separación de proteínas menores a 50KDa, mientras que geles de porcentajes menores sirven para proteínas mayores a 50KDa.

Para el estudio de las proteínas en subunidades o polipeptidos se utilizan sistemas buffer que son encargados de la separación de la proteína en subunidades o polipeptidos individuales. El agente más común es el dodecil sulfato de sodio SDS, que es un detergente iónico que desnaturaliza proteínas y las trasvasa para evitar su plegamiento.

A temperaturas altas y en presencia de SDS, son cortados los enlaces disulfuro de las proteínas y completamente disociados en sus subunidades; las cargas intrínsecas de los polipeptidos son insignificantes con respecto a la carga negativa provista por la unión con el detergente (polipeptido-SDS), estos complejos tienen prácticamente la misma forma y carga negativa, migrando a través de la membrana de poliacrilamida prácticamente con las mismas condiciones y estrictamente de acuerdo al tamaño del polipeptido.

Una vez que se obtuvo la cuantificación de proteínas, se procedió a cargar la muestra en un gel prefabricado de poliacrilamida del 4-12% NuPAGE (INVITROGEN) para su posterior electroforesis. En cada pozo se colocaron las muestras de acuerdo al siguiente recuadro con un volumen final de 20 µl.

Reactivo	WILD TYPE	R1032W	T337S	HEK SIN TRANSFECTAR	MACADOR CONTROL
LDS 4X (μl)	5	5	5	5	0
AGENTE REDUCTOR (μl)	2	2	2	2	0
AGUA DESIONIZADA (μl)	3.3	3.3	5.6	8	0
[] Proteína 30 μg/μl	9.7	9.7	7.4	10	0
VOLUMEN FINAL 20 μl	20 μl				7 μl

Tabla # 3. Cantidad de reactivos en μl. Reactivos utilizados para la electroforesis en gel prefabricado de poliacrilamida del 4-12% NuPAGE (INVITROGEN).

El gel fue previamente lavado con agua corriente retirando los empaques y después se colocó en la cámara de electroforesis, donde se agregó el buffer de corrida, MOPS-SDS 1X. Después de cargar las muestras, con ayuda de la fuente de poder, se inició la electroforesis del gel con un voltaje inicial de 90V, una vez pasados 10 minutos el voltaje fue aumentado a 160V hasta finalizar la electroforesis de las proteínas, aproximadamente una hora después.

Como marcador de peso molecular se utilizó el Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard (Figura # 10) y se colocaron 7μl como indican las especificaciones del producto. Este marcador consiste de 12 marcadores de bandas de proteínas con pesos que van en el rango de 3.5 a 260 KDa. El peso molecular de las proteínas que nos interesa estudiar es de 135 para la proteína inmadura y 155KDa para la

proteína madura, por lo tanto se encontrará en el límite superior de detección de nuestro marcador.

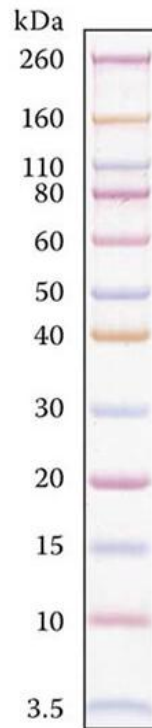


Figura # 11. Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard. Marcador de peso molecular.

VIII.VIII Transferencia e Inmunodetección

El western blot o inmunotransferencia, hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y la detección de estas moléculas con anticuerpos.

Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular, estas se transfieren a una segunda matriz generalmente una membrana de nitrocelulosa o de polifluoruro de vinilideno, PVDF.

Nosotros utilizamos la membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Life Technologies) con un tamaño de poro de 0.45 μm y de acuerdo a las especificaciones del

proveedor, esta membrana brinda la transferencia eficiente de proteínas con un peso molecular mayor a 20 KDa.

La membrana de nitrocelulosa fue previamente bañada en buffer de transferencia (Invitrogen, Life Technologies; Glicina, Tris-HCl y Metanol 10%). Después el gel obtenido de la electroforesis fue removido del cassette, colocado sobre la membrana y ordenado junto con el papel 3M y las esponjas para formar el sándwich de transferencia.

El sándwich, en función de la posición del electrodo negativo, quedó organizado como se muestra en la siguiente ilustración (Figura # 11).

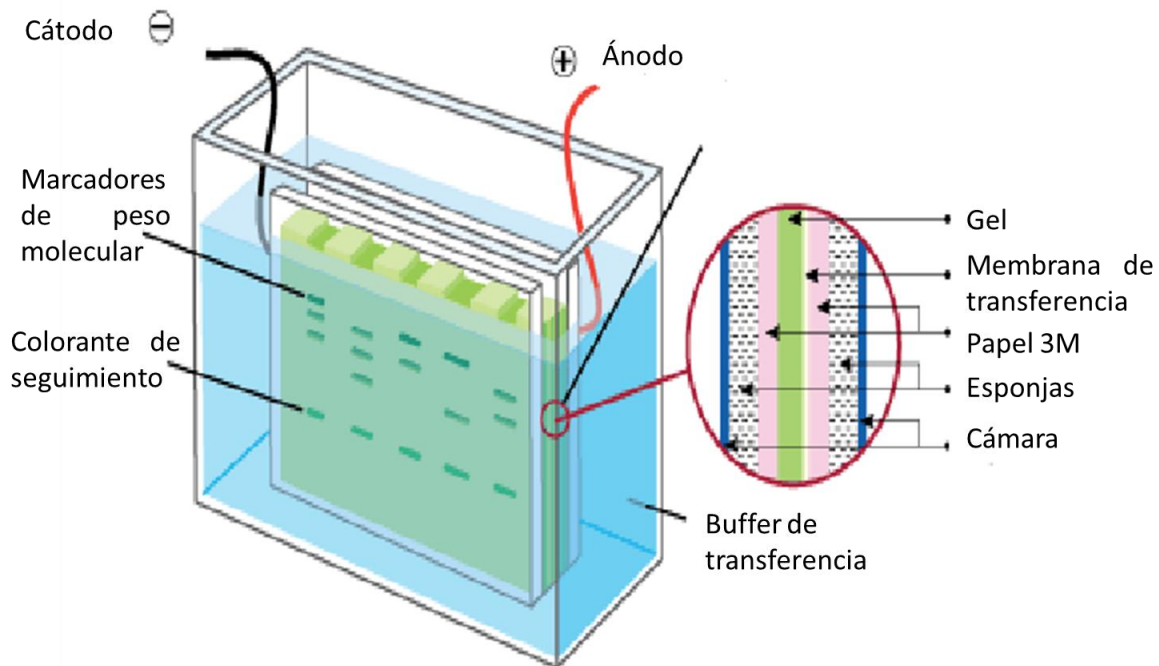


Figura # 12. Orden de la cámara de transferencia. Las bandas obtenidas en la electroforesis son transferidas mediante la aplicación de una corriente eléctrica a una membrana de nitrocelulosa.

De esta manera tuvimos un sándwich, el cual siempre estuvo bañado del buffer de transferencia y ajustado con ayuda de las esponjas a la cámara de corrimiento, las burbujas fueron retiradas con ayuda del rodillo. Una vez colocado en la cámara todo el sándwich, colocamos el buffer de transferencia, y dando unos pequeños golpes a la cámara eliminamos las burbujas remanentes. Además se colocó hielo alrededor y dentro de la cámara, pero no en contacto directo con el buffer de transferencia para evitar degradación de las bandas por calor.

Se inició la transferencia con un voltaje continuo de 30 V por 2 horas a 4°C, de esta manera tendríamos una transferencia lenta y efectiva. Para hacer evidente la transferencia de las bandas desde el gel a la membrana se agregó 5 ml de Rojo Ponceau que revelo un correcto traslado desde el gel a la membrana de nitrocelulosa.

Después del teñido, la membrana fue 3 veces lavada con una solución salina amortiguadora, Tris Buffered Saline, with Tween® 20 TBST, para el bloqueo de la membrana.

VIII.IX Marcaje con anticuerpos

El bloqueo de la membrana se lleva a cabo incubando la membrana con una solución que obstruye los lugares de unión no específicos del anticuerpo.

Se incubo la membrana con leche en polvo sin grasa, Nonfat-Dried Milk bovine al 5% (Sigma-Aldrich) diluido en buffer salino de bloqueo con Tween 20 (TBST) por una hora, en agitación continua a temperatura ambiente. Posterior a esto la membrana fue lavada 3 veces con TBST para proceder a la incorporación con el anticuerpo primario.

Para la detección de la proteína se utilizó el método de detección indirecta, utilizando dos anticuerpos, un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario el cual esta conjugado con un marcaje detectable como es la quimioluminiscencia y utilizan comúnmente anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) Figura #12.

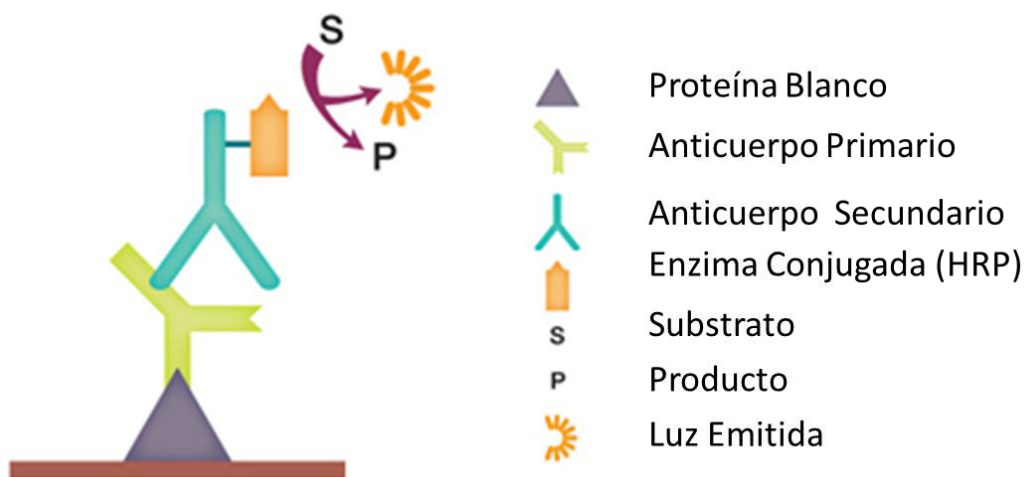


Figura # 13. Método de detección indirecta de anticuerpos. Reacción de quimioluminiscencia producida por la adición de un sustrato a la enzima conjugada (HRP) para obtener como producto, la luz.

La reacción entre la enzima y el sustrato produce luz que puede ser detectada mediante la exposición de la membrana a papel fotosensible.

Después del proceso de bloqueo de la membrana, se procedió con la incubación del anticuerpo primario para nuestra proteína de interés HERG, como para nuestra proteína control β -actina.

El anticuerpo anti-Kv 11.1 SIGMA ALDRICH, fue desarrollado en conejo usando el péptido AFLKETEETEG-PPATEC correspondiente a los residuos 430-445 del Kv 11.1 de humano.

El anticuerpo monoclonal anti- β -actina isotipo de ratón IgG1, (SIGMA ALDRICH) fue producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de la cepa de ratón BLB/c, con una modificación sintética de β -actina citoplasmica en

la región N-terminal NDDIAALVIDNGSGK conjugado con KLH, del inglés *key limped hemocyanine*.

Posterior a esto se procedió al revelado de la membrana con Super Signal™ WestPico sustrato quimioluminiscente.

NOMBRE	COMPAÑÍA	Nº DE CATALOGO	DILUCION PARA WB	DILUCION PARA IF	PROCEDENCIA
β-Actina	SIGMA	A1978	1:1000		Ratón
Anti Kv 11.1	SIGMA	P0749	1:200	1:25	Conejo
Anti-Rabbit IgG HRP	PROMEGA	W401B	1:5000		Cabra
Anti-Mouse IgG HRP	PROMEGA	W402B	1:5000		Cabra
Rodamina-Faloidina	LIFE TECHN.	R415		1:500	

Tabla # 4. Anticuerpos utilizados para western blot e inmunofluorescencia. Todos los anticuerpos utilizados para western blot fueron diluidos en buffer salino de bloqueo con Tween 20 (TBST).

VIII.X Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica utilizada para visualizar la distribución de una proteína o un antígeno específico en células o secciones de tejido, utilizando la especificidad de los anticuerpos por su antígeno, para dirigir marcadores fluorescentes a las biomoléculas diana de forma específica.

Existen dos tipos principales de métodos de marcaje en inmunofluorescencia; marcaje directo, en el que el anticuerpo primario está unido con un marcador fluorescente y marcaje indirecto en el que se tiene un anticuerpo primario y un secundario unido a un fluorocromo.

Las células utilizadas para inmunofluorescencia fueron sembradas en cubreobjetos que previamente fueron lavados y esterilizados en luz ultravioleta, por 15 minutos. Posterior a esto, a cada vidrio se le colocó 3 ml de gelatina al 0.1% diluida en agua estéril por 3 horas incubadas a 37°C.

Los vidrios se lavaron con PBS estéril y después se sembraron las células. Cuando las células alcanzaron una confluencia cercana del 60%, fueron retiradas del incubador para su fijación.

La fijación de las células se llevó a cabo con paraformaldehído al 3.7%, previo lavado con PBS para eliminar el medio de mantenimiento y las células no adheridas.

El paraformaldehído al 3.7% se colocó por 10 minutos y después las células fueron lavadas 3 veces consecutivas con PBS no estéril, dejando en cada lavado un tiempo aproximado de 3-5 minutos a temperatura ambiente.

Posterior a esto, las células fueron incubadas por 45 minutos con los anticuerpos anti-Kv11.1 (SIGMA). Posteriormente las células fueron lavadas por PBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo para marcar la proteína de interés.

Para el caso del núcleo, las células fueron marcadas con DAPI, el cual es un marcador fluorescente, que se une fuertemente a regiones ricas en adenina y timina marcando mayormente al núcleo.

Como marcador del citoesqueleto se utilizó Rodamina-Faloidina (INVITROGEN, Life Technologies). La faloidina es un péptido bicíclico y pertenece a una familia de toxinas aisladas de *Amanita phalloides*, se utiliza comúnmente para marcar F-actina, debido a sus propiedades de unión con actina.

Posteriormente las muestras se montaron en portaobjetos que fueron previamente lavados con EtoH. Después de haber marcado las células con los anticuerpos fueron lavados los cubreobjetos con PBS y montados sobre el portaobjetos con una gota de nuestra solución de montaje Vectashield.

Se colocó el cubreobjetos sobre el portaobjetos, para después sellar los bordes con esmalte de uñas y se dejó a temperatura ambiente toda la noche para su posterior revelado en el microscopio confocal.

VIII.XI Electrofisiología

La electrofisiología es el estudio de las propiedades eléctricas de células y tejidos. Esto significa que, esta técnica nos permite medir los cambios en las corrientes o en el voltaje de membrana, en sistemas que van desde un canal único hasta célula completa o un tejido.

La técnica que utilizamos para medir las corrientes de potasio fue Patch Clamp en su modalidad de fijación de voltaje y en su configuración de célula completa. Como amplificador utilizamos el MutiClamp 700B y la tarjeta digitalizadora 1440A. La frecuencia de captura fue de 10 KHz.

La solución extracelular contenía las siguientes sales en concentración mM: 140 NaCl, 1 CaCl, 1 MgCl, 4 KCl, 10 HEPES, 5 Glucosa y un pH de 7.4 ajustado con NaOH.

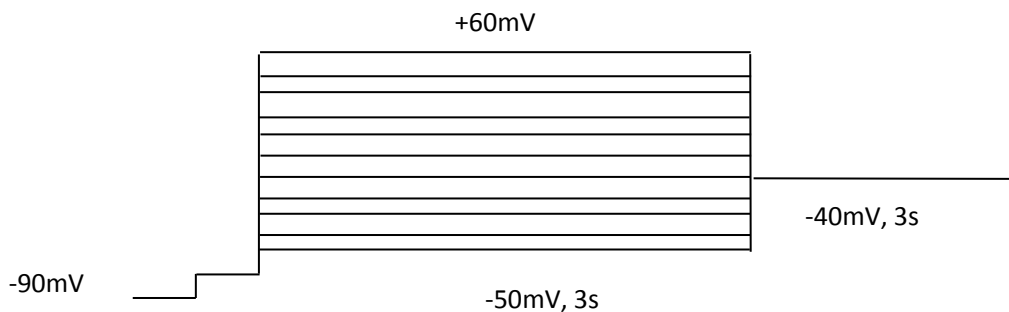
Los electrodos fueron de borosilicato con una resistencia de entre 2 y 3 M Ω y fueron llenados con solución intracelular conteniendo en mM: 140 K-aspartato, 10 EGTA, 4 MgATP, 1 MgCl₂, 10 HEPES. El pH de esta solución fue ajustado a 7.2 con KOH.

Los protocolos de voltaje utilizados fueron los siguientes:

Protocolo 1

Este protocolo de voltaje fue utilizado para obtener la curva corriente vs voltaje (I-V) y activación en estado estable. Las células se mantuvieron a un voltaje de membrana de -90 mV seguido por pulsos despolarizantes de 10 mV, desde -60 mV hasta +50 mV durante 3 segundos seguido de un voltaje sostenido de -40 mV por 3 segundos para evocar las corrientes de cola. Finalmente regresábamos al potencial de mantenimiento.

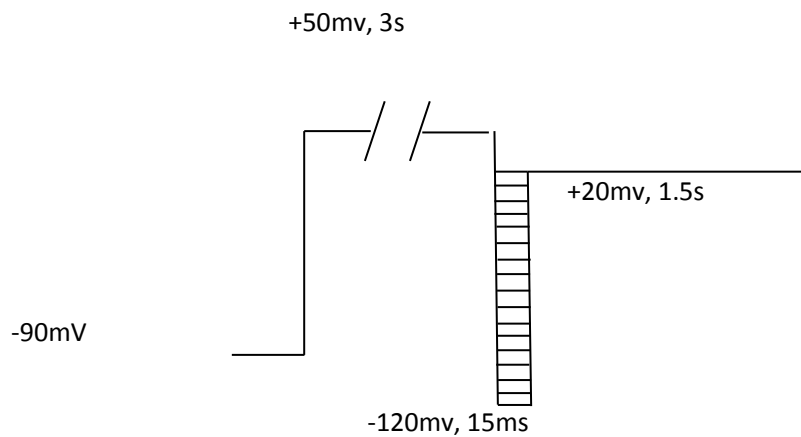
Protocolo I-V



Protocolo 2

Este protocolo de voltaje fue utilizado para obtener la inactivación en estado estable de la corriente. Las células parten de un voltaje de membrana de -90 mV seguido por un pulso despolarizante sostenido de 3 segundos a $+50$ mV. Posteriormente se realizan pulsos repolarizantes de 15 ms, cada 10 mV desde los -120 mV a $+20$ mV. Finalmente, la célula es mantenida a $+20$ mV durante 1.5 segundos.

Inactivación en Estado Estable



IX. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos en los experimentos de patch clamp serán medidos usando el programa ClampFit 10.0 (Molecular Devices). Para realizar la curva IV se medirán los últimos 50 ms del pulso de prueba (protocolo de I-V), se obtendrán los valores medios de corriente para cada mutante y se graficarán en función del voltaje. En el

caso del protocolo de inactivación y activación en estado estable mediremos la corriente máxima generada por el pulso de prueba, obtendremos el valor medio para cada mutante y lo graficaremos en función del voltaje. La comparación de la corriente generada entre las mutantes y el canal nativo se realizara con una prueba T de Student no pareada. Los valores serán considerados como estadísticamente diferentes cuando el valor de significancia sea menor al 0.05.

X. ASPECTOS BIOÉTICOS

Los pacientes acudieron de manera libre a la Fondazione Salvatore Maugeri y firmaron un acuerdo de consentimiento informado para la realización de las pruebas diagnósticas clínicas, sin embargo, en este estudio no utilizamos ningún tejido o célula que derivara directamente del paciente. De hecho, la información recabada deriva del Banco de Datos de Mutaciones de la Fundación Salvador Maugeri (www.triad.fsm.it/cardmoc/) y tanto los vectores con el gen del canal iónico como las células usadas para transfectarlos fueron adquiridos en una casa comercial.

XI. RESULTADOS

XI.I Expresión de la forma nativa del canal de potasio HERG y de las mutantes HERG R1032W y HERG T337S en la línea celular HEK 293

El primer paso, después de haber obtenido el ADN del canal nativo de HERG y de las mutantes R1032W y T337S fue expresarlos, usando la técnica de transfección, en un sistema heterologo como son las células HEK 293 A.

En el caso de las células que usamos para los experimentos de electrofisiología, el ADN de nuestra proteína de interés se cotransfectó con la proteína reportera verde fluorescente (GFP), y una forma sencilla de verificar la eficiencia de la transfección fue a través de la microscopia de fluorescencia. Con este método encontramos que cerca del 60% de las células observadas eran fluorescentes. Sin embargo, con este método no podemos asegurar que las células fluorescentes expresen el canal de interés además de la GFP; por esta razón y para corroborar la efectividad de la transfección se realizó una inmunofluorescencia contra el canal Kv. 11.1, contratiñendo el núcleo y citoesqueleto para verificar la viabilidad de las células obteniendo los siguientes resultados.

En la figura # 14 observamos mediante el marcaje con anticuerpos la expresión de la proteína HERG tanto para el canal nativo como para las mutantes R1032W y T337S, además observamos en color azul la presencia de un núcleo bien definido debido a la presencia del colorante DAPI que se une a las regiones ricas en las bases adenina y timina de los ácidos nucleicos. Por otro lado, para verificar la morfología de las células marcamos nuestro citoesqueleto con Faloidina y verificamos que nuestras células después de haber sido transfectadas mantuvieran su morfología. En la columna de la derecha se observa la definición del cuerpo celular en color rojo.

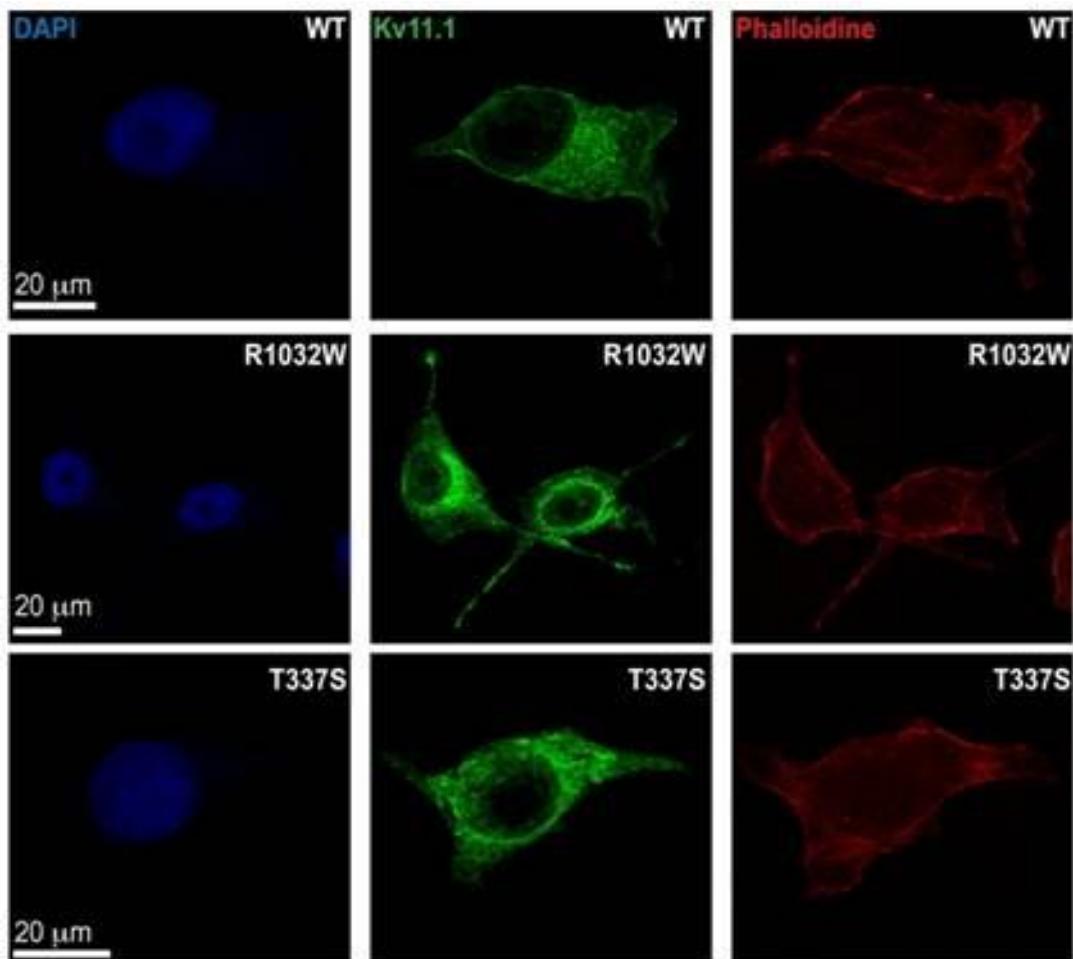


Figura # 14. Inmunofluorescencia para canal de potasio HERG. En color azul podemos observar al núcleo teñido con DAPI, en verde tenemos el canal de potasio HERG y en rojo el marcaje del citoesqueleto con faloidina.

En la figura # 15 observamos en contraste de fases las células transfectadas y podemos notar como el citoesqueleto define completamente la morfología celular (columna central) y al mismo tiempo nótese que en la sobre posición de las imágenes obtenidas (columna de la derecha) encontramos zonas en la periferia que coinciden con la ubicación del canal HERG en la membrana plasmática y zonas más cercanas al núcleo que indican los canales inmaduros o los reciclados.

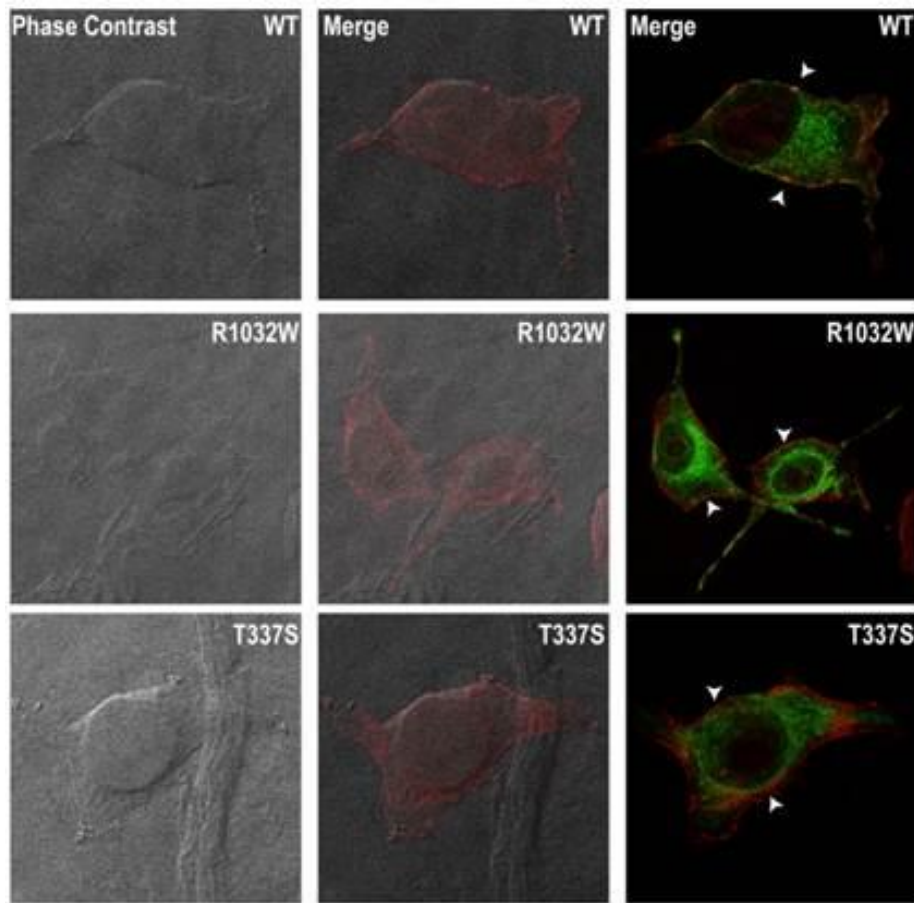


Figura # 15. Contraste de fases y sobreposición de imágenes. En el contraste de fases se aprecia la morfología de las células y en sobreposición de las imágenes con anticuerpos, se puede apreciar en la periferia, la presencia del canal HERG marcado con anticuerpo, comprobando la correcta expresión en la línea celular.

Estos resultados validan el uso del método de transfección y de la línea celular HEK 293A como modelo experimental para la expresión de los canales iónicos y su posterior estudio electrofisiológico.

XI.II Funcionalidad del canal de potasio HERG en la línea celular HEK 293A.

Una vez que comprobamos que las células expresaban los diferentes canales iónicos de potasio sin perder su morfología, procedimos a ver si los canales transfectados eran funcionales. Para ello, nos valimos de la técnica de Patch Clamp en su modalidad de fijación de voltaje.

En los registros realizados en las células transfectadas con el canal de potasio no mutado, podemos observar como al aplicar pulsos despolarizantes, la corriente comienza a aparecer a partir de -40 mV y alcanza un valor máximo a los 20 mV, para luego disminuir conforme aumenta la amplitud del voltaje de despolarización; este proceso es característico de este canal de potasio y se le denomina rectificación (Figura # 16). Estos resultados los podemos observar más claramente en la curva IV donde, para eliminar la variabilidad que pudiera ocasionar el tamaño de la célula, dividimos los valores de la corriente por la capacitancia celular y graficamos su valor promedio con respecto al pulso de voltaje aplicado (Figura # 17). Los datos obtenidos concuerdan por los descritos en la literatura según los cuales la corriente I_{Kr} es caracterizada por una activación a valores umbrales de -40 mV a -30mV y alcanza un pico máximo de corriente a +20mV (Trudeau et al., 1995).

Cuando registramos las células transfectadas con la mutante R1032W, encontramos un comportamiento muy parecido al del canal WT, con una activación de la corriente a -40mV y con el proceso de rectificación a partir de los 20 a 30 mV, aunque a diferencia del canal control, la corriente máxima se alcanzó a +10 mV y la amplitud de corriente al pico generada fue 30% menor (Figura # 17 y 18).

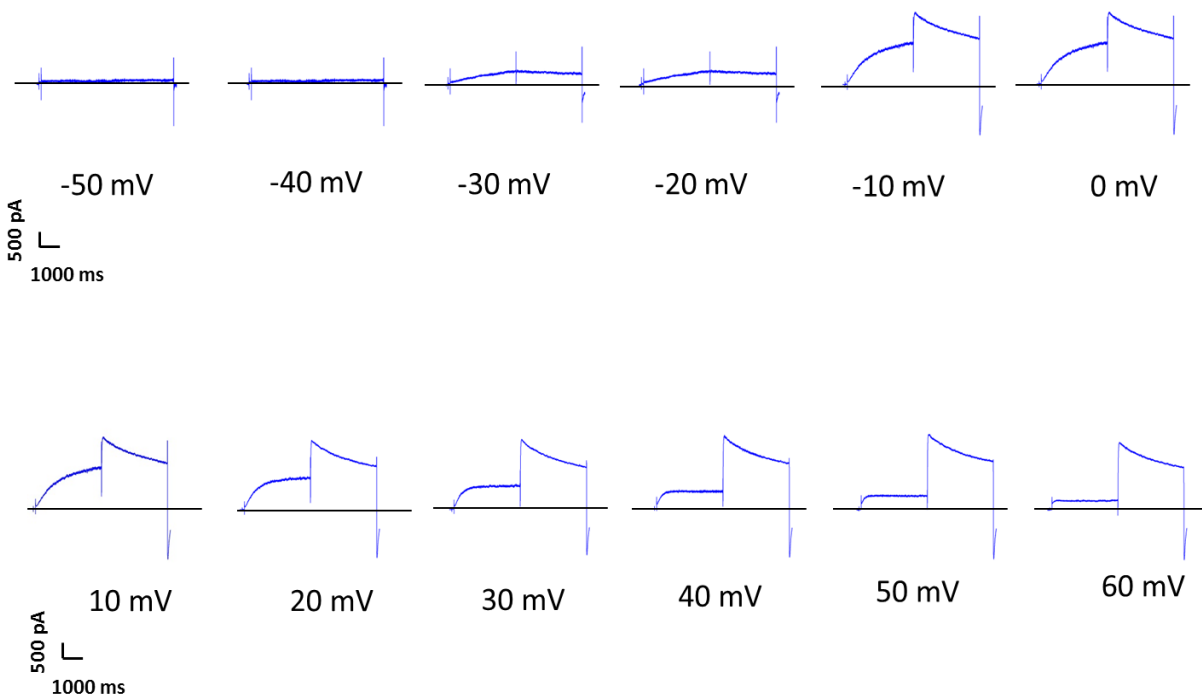


Figura # 16. Registro de la corriente iónica HERG, con pulsos despolarizantes. Las células HEK fueron registradas con pulsos despolarizantes desde -50mV a +60 mV, en esta imagen podemos observar que la corriente aparece cuando aplicamos el pulso de -40 mV, alcanzando el máximo de corriente a 20 mV y después comienza a decaer conforme avanzan los pulsos despolarizantes.

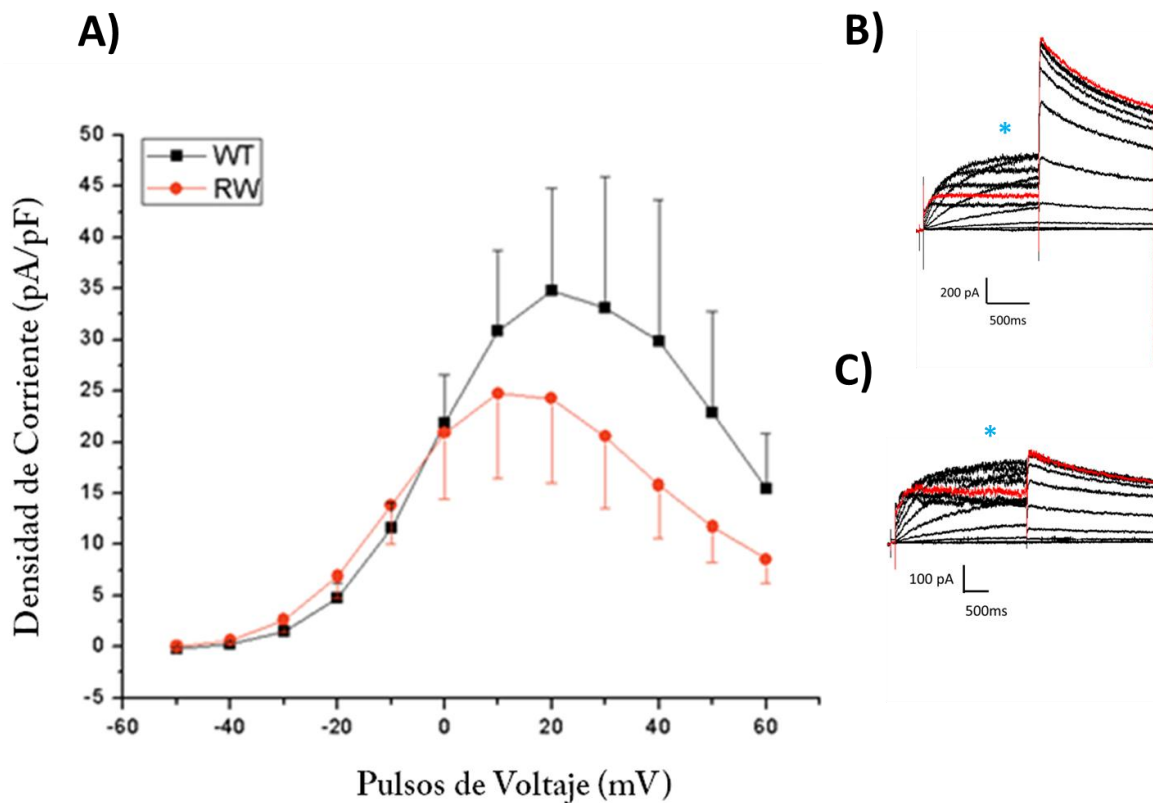


Figura #17 Medición de la corriente de potasio HERG WT y HERG R1032W. A) La corriente I_{K_r} en el canal WT es caracterizada por activación en valores aproximados de -40mV a +30mV alcanzando su pico máximo de corriente en +20mV (cuadros negros, $n=17$). En el caso de la mutante (cuadros en rojo, $n=10$), observamos una disminución de la densidad de la corriente y cambios en el pico máximo de corriente. B) Trazos representativos de la corriente en el canal nativo. C) Trazos representativos de la corriente en el canal mutado R1032W.

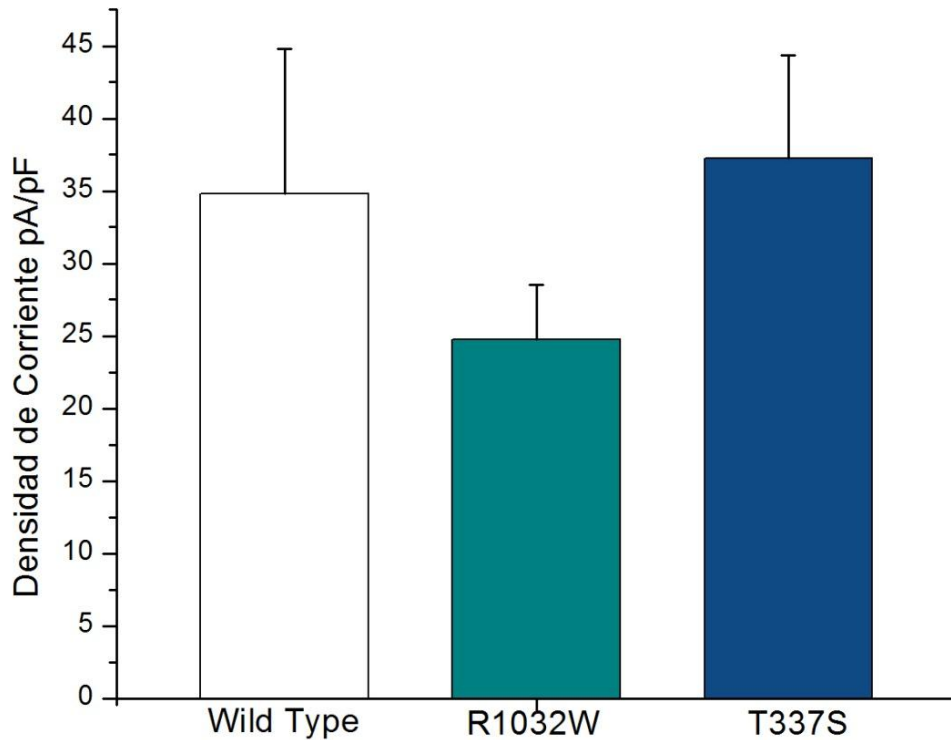


Figura #18 Gráfico de barras de la corriente al pico generada por HERG WT y HERG R1032W. La densidad de la corriente máxima generada por el canal wild type es distinta a la originada por las mutantes R1032W y T337S. En la mutante R1032W encontramos una disminución en la densidad de la corriente cercana a un 30%, mientras que en la mutante T337S no encontramos diferencias significativas.

Por su parte, en la mutante T337S, para eliminar la variable del cambio de tamaño de la célula, se dividió la corriente originada por la capacitancia de la célula y se graficó su valor promedio con respecto al pulso de voltaje aplicado. La curva I-V de la mutante alcanza una mayor densidad de corriente a +20 mV en comparación con el canal nativo, pero sin diferencias estadísticamente

significativas (Figura #18). De la misma manera que el canal WT, la mutante T337S tiene un comportamiento similar, con activación de la corriente a -40 mV y un proceso rectificante a partir de los +20 mV (Figura # 19).

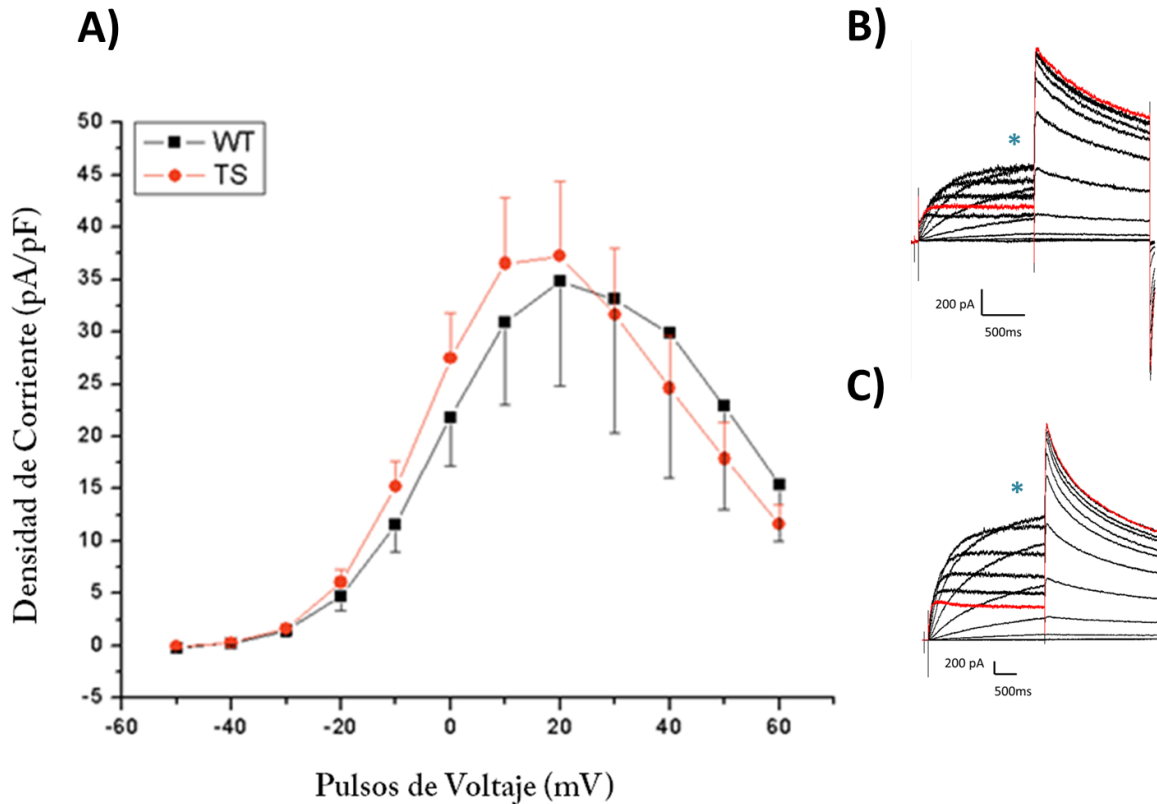


Figura #19 Medición de la corriente de potasio HERG WT y HERG T337S. A) Curva I-V del canal nativo (cuadro negro, n=17) y de la mutante T337S (cuadros en rojo, n=13), se puede apreciar un ligero aumento de la densidad de la corriente pero este cambio no es significativo. B) Trazo representativo de la corriente del canal nativo. C) Trazo representativos del canal mutante T337S.

Si observamos las curvas IV para ambas mutantes, veremos que en ambos casos hay un corrimiento de la curva de corriente hacia valores más negativos (ver voltaje de -40 a + 20mV y de +30 a +60mV en las figuras # 17 y 19), esto podría

deberse a cambios en la propiedades del canal, específicamente la dependencia del voltaje del proceso de activación y de inactivación.

Para explorar esta posibilidad nos dispusimos a realizar la gráfica de activación e inactivación en estado estable del canal WT y de las mutantes R1032W y T337S.

La dependencia de voltaje del proceso de activación de los Kv 11.1 es medida analizando la amplitud de las corrientes de cola como fue descrito por *Liu* en 1997. Estas corrientes son evocadas en el segundo pulso de voltaje del protocolo 1 (Ver material y métodos). Después de la activación de los canales en el primer pulso, los canales estarán en estado abierto o inactivo y al llevarlos a un voltaje de -40mV, los canales inactivos pasaran por el estado abierto antes de llegar al estado cerrado, por lo tanto, la corriente que veremos a -40mV, será la corriente generado por todos los canales que se activaron en el pulso previo de voltaje. Esto asegura una fiel representación de la proporción de canales activados durante el pulso 1 sin la intervención de la inactivación. En otras palabras, podremos analizar la proporción de canales que se encuentran en estado abierto o cerrado a un determinado voltaje.

Los datos obtenidos de las corrientes de cola fueron normalizados con respecto al valor máximo de corriente y graficados en función del voltaje del pulso 1. Una vez normalizados los datos se ajustaron con una ecuación de Boltzmann para obtenerlos los valores de $V_{1/2}$ y K . La $V_{1/2}$ es el voltaje medio de activación para el cual la mitad de canales son activados, mientras que la K representa la pendiente o tasa de cambio de la corriente con respecto al voltaje.

En la figura # 20 observamos la gráfica de activación en estado estable para el canal nativo y para la mutante R1032W. En este caso se hace más evidente como hay un corrimiento hacia valores más negativos del proceso de activación en los canales mutantes R1032W, lo cual se corrobora al comparar el voltaje medio de activación que pasó de 3.05 ± 3.02 mV en el canal nativo a -11.00 ± 3.37 mV en la mutante ($p < 0.01$). El ajuste con la ecuación de Boltzmann no arrojó cambios significativos en el factor de pendiente de la curva (Tabla # 5).

De manera análoga a la mutación R1032W, la mutante T337S, presentó un voltaje medio de activación más negativo que el canal nativo, de 3.05 ± 3.02 mV a -4.26 ± 2.1 mV, sin embargo, en este caso, no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura # 21 y Tabla # 5).

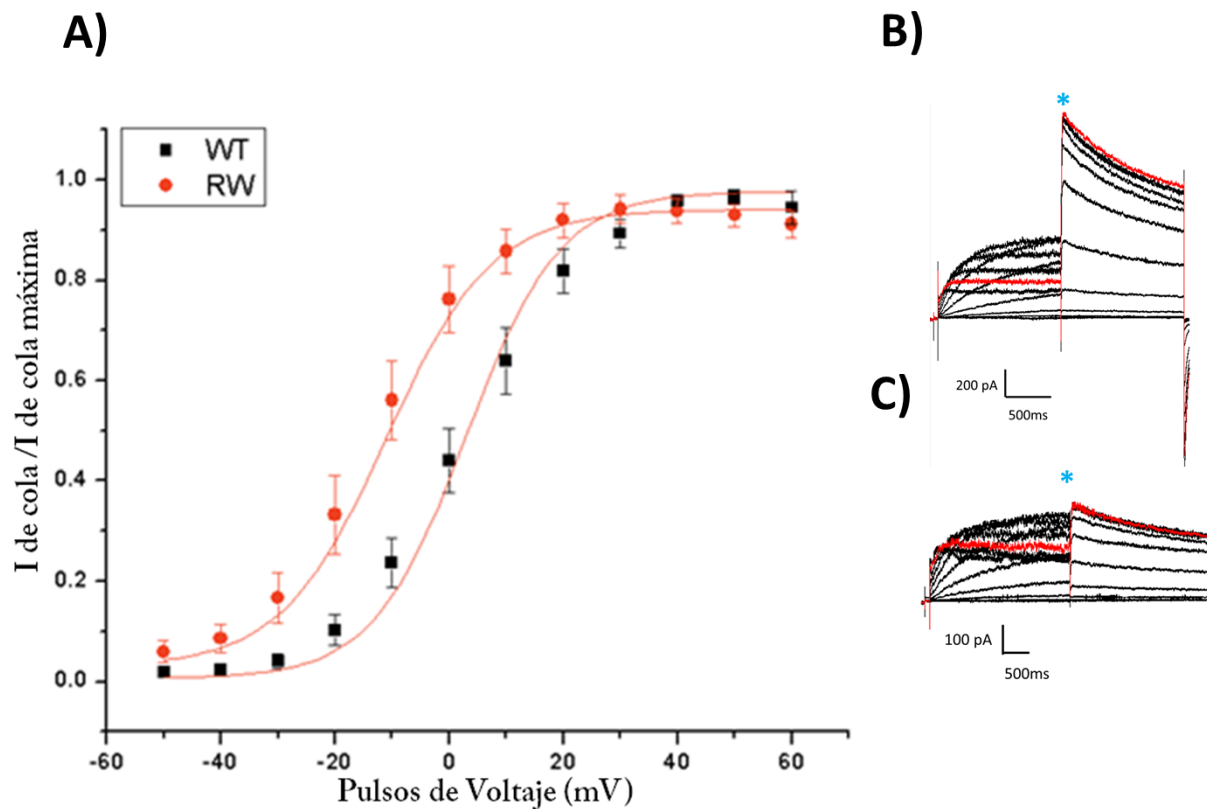


Figura #20 Gráfica de activación en estado estable para canal nativo y mutante R1032W.

A) En esta grafica apreciamos un cambio en el voltaje medio de activación que pasa de $3.05 \pm$ mV en el canal nativo a $-11.00 \pm$ (n=17) en la mutante R1032W con una p de 0.01(n=9) .B) Trazo representativo de la corriente en el canal nativo C) Trazo representativo de la corriente en el canal mutado R1032W.

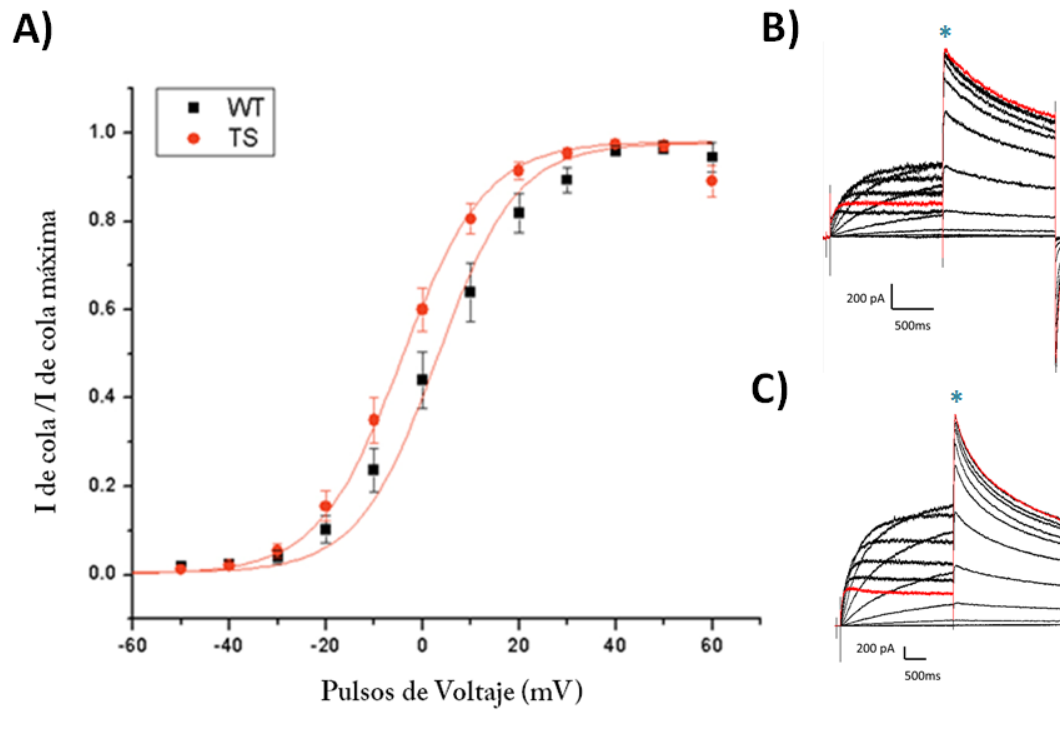


Figura #21 Grafica de activación en estado estable para canal nativo y mutante T337S.

A) En esta grafica apreciamos un cambio en el voltaje medio de activación que pasa de 3.05 ± 3.02 mV ($n=17$) en el canal nativo a -4.26 ± 2.1 mV en la mutante T337S con una p de 0.09($n=11$), siendo el resultado no significativo. B) Trazo representativo de la corriente de potasio HERG en el canal nativo. C) Trazo representativos de la corriente de potasio HERG en el canal mutado T337S.

Activación en Estado Estable	Wild Type	R1032W		T337S	
	Media ± Error Estándar	Media ± Error Estándar	Valor de p	Media ± Error Estándar	Valor de p
$V_{1/2}$	3.05 ± 3.02	-11 ± 3.37	0.01	-4.26 ± 2.10	0.09
K	8.22 ± 0.47	9.22 ± 1.31	0.39	8.66 ± 0.53	0.55

Tabla #5 Valores de $V_{1/2}$ y K para activación en estado estable de los canales de potasio. La $V_{1/2}$ representa el voltaje al cual se encuentran activados el 50 % de canales disponibles a ser activados y la K representa el factor pendiente de la curva de activación. Encontramos un cambio significativo con una p de 0.01, en el voltaje medio de activación del canal R1032W con respecto al WT, mientras que el análisis de la mutación T337S no muestra cambios significativos.

Para analizar la inactivación en estado estable, se utilizó el protocolo número 2, el cual consiste de tres distintos pulsos de voltaje. Cada uno de estos tres pasos da origen a distintos estados del canal, siendo el pulso 3 o también denominado pulso de prueba, el momento en el cual vamos a medir la inactivación en estado estable.

Después de la activación de los canales durante el primer pulso, los canales se encuentran en estado abierto y como el pulso es sostenido en tiempo y voltaje los canales toman dos estados, abierto o inactivo. Cuando aplicamos el segundo pulso corto a voltajes hiperpolarizantes, los canales inactivados se recuperan de la inactivación y dependiendo del voltaje podemos tener hasta el 100% de canales

en estado abierto. Finalmente, con el tercer pulso despolarizante, el aumento en el gradiente electroquímico genera una gran corriente que dependerá de la cantidad de canales que se han recuperado de la inactivación y que se encuentren en estado abierto.

El gráfico de inactivación en estado estacionario se realiza midiendo la corriente al pico al inicio del pulso 3, después estos valores se normalizan por la corriente máxima y se grafican en función del voltaje del paso 2. Finalmente, el gráfico se ajusta con una ecuación de Boltzmann para obtener los valores de $V_{1/2}$ y K . Dado que el proceso de inactivación es inmediato a voltajes despolarizantes, es necesario ajustar el decaimiento de la corriente en el paso 3 con una exponencial para calcular el valor teórico de la corriente máxima. De hecho, este es el valor usado para construir el gráfico de inactivación en estado estable.

En la figura # 22 encontramos el gráfico de la inactivación en estado estable para el canal nativo y para la mutante R1032W. En esta gráfica observamos que el voltaje medio de inactivación sufre cambios pero estos no son significativos, pasando de -65.91 ± 4.71 mV en el canal nativo a -73 ± 5.85 mV en el canal mutado R1032W, con una p de 0.34 (ver Tabla # 6).

Por otro lado, en la mutante T337S encontramos que, al compararla con el canal nativo, el voltaje medio de inactivación es de -65.91 ± 4.71 mV mientras que para el canal mutante T337S tiene un voltaje medio de inactivación de -73.60 ± 2.24 mV, con una p de 0.21, siendo estos resultados no significativos (Figura#23 y Tabla # 6)

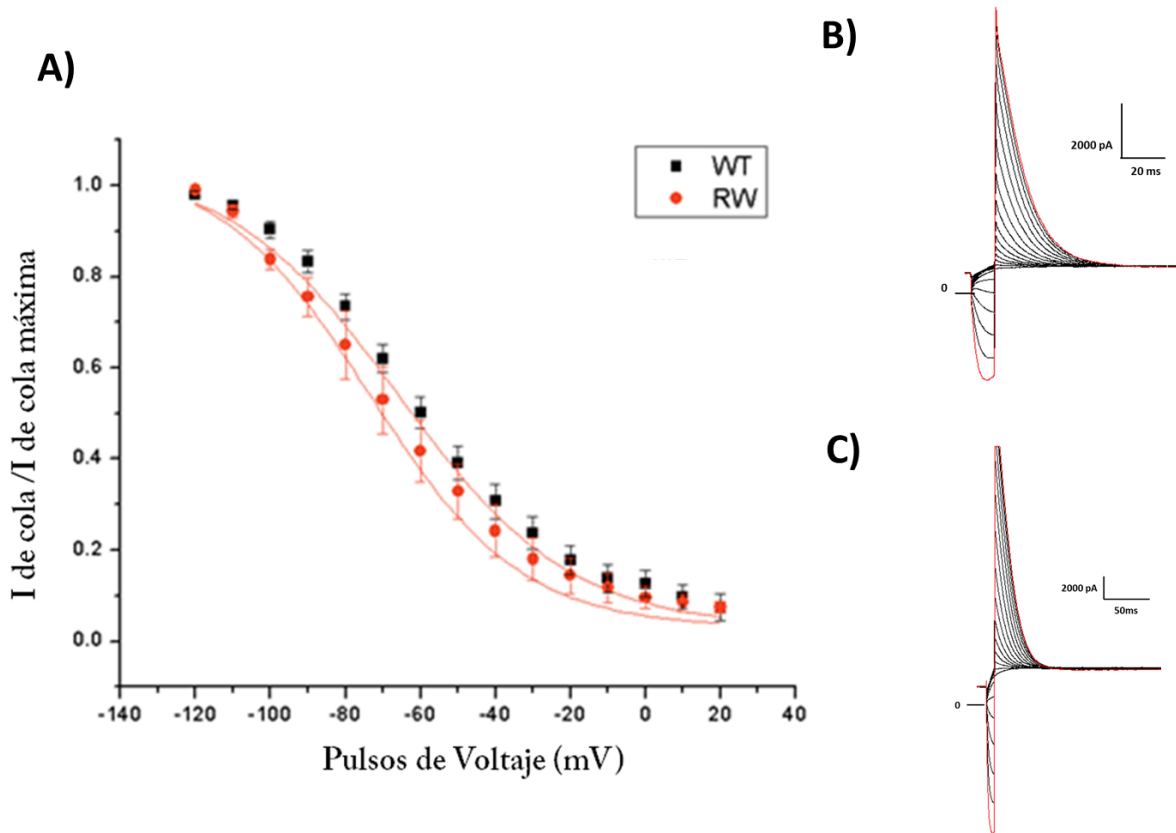


Figura #22 Gráfica de inactivación en estado estable para el canal nativo y el mutante R1032W. A) En esta grafica podemos observar un cambio en el voltaje medio de inactivación que pasa de -65.91 ± 4.71 mV en el canal nativo (n=13) a -73.46 ± 5.85 mV en la mutante R1032W con una p de 0.34 (n=7), siendo el resultado no significativo. B) Trazo representativo de la corriente de potasio HERG del canal nativo. C) Trazo representativos de la corriente de potasio HERG del canal mutado R1032W.

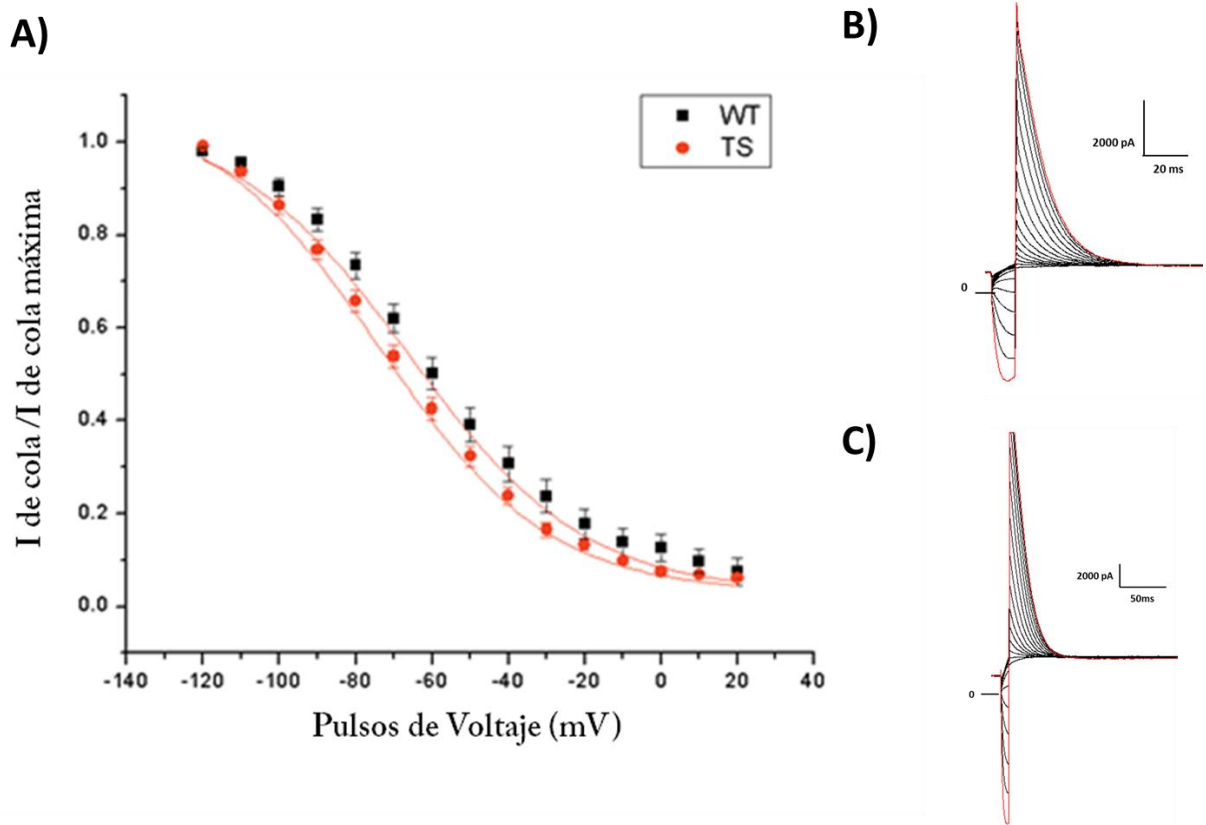


Figura #23 Grafica de inactivación en estado estable para canal nativo y mutante T337S. En esta grafica encontramos un cambio en el voltaje medio de inactivación que pasa de -65.91 ± 4.71 mV ($n=13$) en el canal nativo a -73.60 ± 2.24 mV en la mutante T337S con una p de 0.34 ($n=9$), en este caso el resultado no fue significativo. B) Trazo representativo de la corriente de potasio HERG del canal nativo. C) Trazo representativos de la corriente de potasio HERG del canal mutado T337S.

Inactivación en Estado Estable	Wild Type	R1032W		T337S	
	Valor \pm Error Estándar	Valor \pm Error Estándar	Valor de p	Valor \pm Error Estándar	Valor de p
$V_{1/2}$	-65.91 \pm 4.71	-73.46 \pm 5.85	0.34	-73.60 \pm 2.24	0.21
K	22.94 \pm 2.09	20.14 \pm 1.28	0.37	22.17 \pm 0.76	0.77

Tabla #6 $V_{1/2}$ y K para inactivación en estado estable. La $V_{1/2}$ representa el voltaje al cual se encuentran inactivados el 50 % de canales disponibles y la K representa el factor pendiente de la curva de inactivación. Las mutantes R1032W y T337S no tienen cambios significativos en los parámetros $V_{1/2}$ y K con respecto al canal wild type.

XI.III Cambios en la expresión de proteínas mutantes con respecto a las proteínas nativas del canal de potasio HERG.

Algunas de las alteraciones más frecuentes ocasionados por la mutaciones en los genes que codifican para canales iónicos son cambios en su expresión o localización celular. Esto se debe a que las mutaciones afectan la estructura terciaria de la proteína y su interacción con proteínas chaperonas, condicionando así su tráfico celular, estabilidad y funcionalidad (Hsiao Pi Yin, 2013). Para determinar si los cambios encontrados en la función del canal, podrían ser debidos a variaciones en la expresión de las proteínas ocasionadas por las mutaciones,

decidimos realizar un western blot para cuantificar la cantidad de canales iónicos presentes en las células. El análisis de la expresión de las proteínas podría revelar si la disminución en la densidad de la corriente observado en la mutante R1032W es debido a una disminución de la expresión del canal o a cambios en su funcionamiento.

Para cuantificar la expresión total de los canales iónicos, usamos células transfectadas con cada uno de los canales de interés, extraímos las proteínas y realizamos su separación electroforética en un gel de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF para realizar la inmunodetección del canal de potasio Kv 11.1. En este punto, para verificar que las proteínas se hubieran transferido correctamente, teñimos la membrana con el colorante rojo de Ponceau. En la figura #24 podemos observar cuatro carriles diferentes: el primero corresponde a las proteínas indicadoras del peso molecular; los 3 carriles de la derecha corresponden a las proteínas extraídas de las células transfectadas con el canal nativo, el mutante R1032W o con la mutante T337S. En estos últimos carriles podemos observar a diferencia del carril número 1, un continuo de bandas a lo largo de toda la membrana, lo cual es indicativo de los diferentes tamaños de proteínas presentes en las células HEK.

Una vez que comprobamos la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, procedimos a realizar la inmunodetección del canal de potasio Kv11.1 en la membrana de PVDF. Para ello utilizamos un anticuerpo monoclonal dirigido contra la porción carboxilo terminal de canal. En la figura # 25 tenemos el revelado de la membrana por medio de quimioluminiscencia y podemos observar como en las tres condiciones de transfección encontramos la proteína Kv 11.1, con un peso molecular de 135 kDa para la proteína inmadura y de 155kDa para la proteína madura. Además en las células control sin transfectar, no obtenemos las bandas observadas en las condiciones transfectadas, confirmando que no existe una expresión endógena del canal HERG en las células HEK. Como control de cargado usamos a la proteína de expresión constitutiva actina, cuyo peso es de 42kDa.

Finalmente, una vez de corroboramos la expresión del canal HERG en las células transfectadas, procedimos a cuantificar su expresión para determinar si había o no cambios con respecto a la expresión del canal nativo. En la figura # 11 les muestro un gráfico en donde se observa que en las células transfectadas con los canales mutantes, aumenta la expresión del canal, aunque este aumento no es estadísticamente significativo con respecto al canal WT ($p>0.05$). La expresión de proteína actina fue usada como normalizador para comparar los cambios en la expresión de los canales iónicos entre cada uno de las mutantes y el canal nativo.

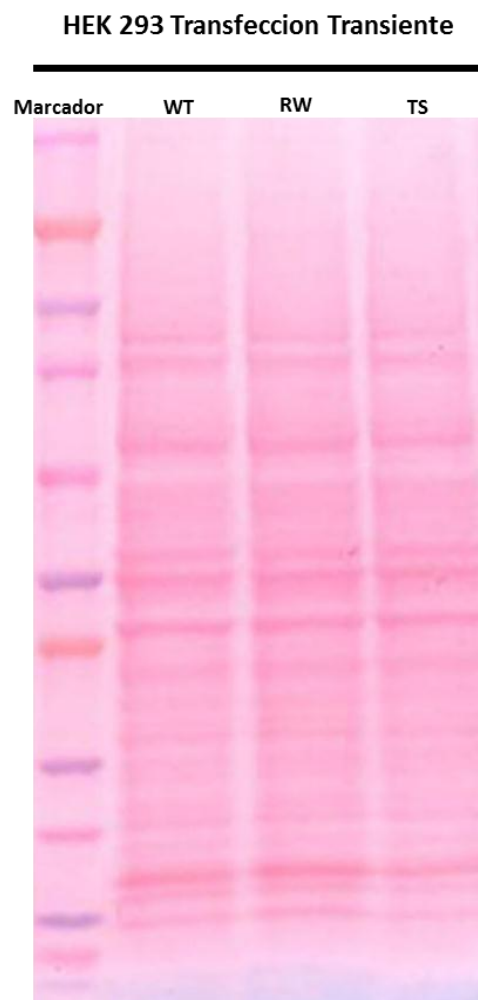


Figura #24 Revelado de la membrana con Rojo Ponceau. Se puede observar una correcta transferencia de las proteínas del gel de electroforesis hacia la membrana de nitrocelulosa.

HEK 293 TRANSFECCIÓN TRANSIENTE

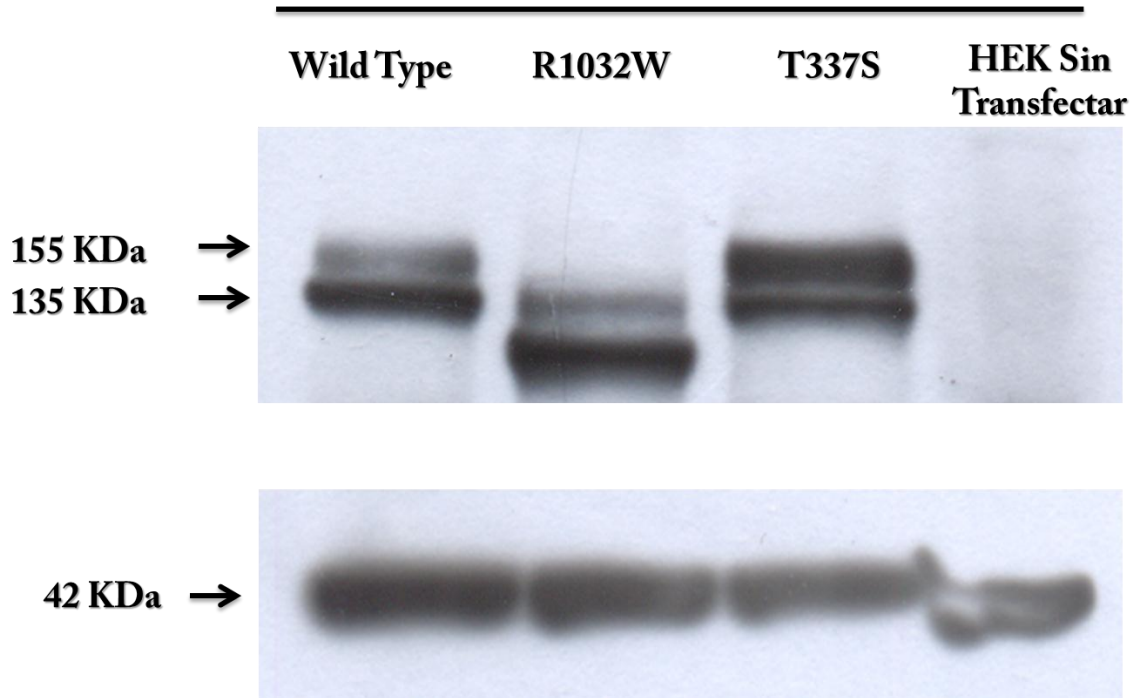


Figura #25 Revelado de la membrana con el método de quimioluminiscencia. En el western blot observamos las dos típicas bandas para el canal Kv 11.1 de 135kDa para la proteína inmadura y 155kDa para la proteína madura. Como control negativo tenemos a las células sin transfectar. Usamos a la proteína actina de 42 kDa de peso molecular como control de expresión. En nuestra línea celular sin transfectar no se encuentra la banda de la proteína HERG pero si la de actina.

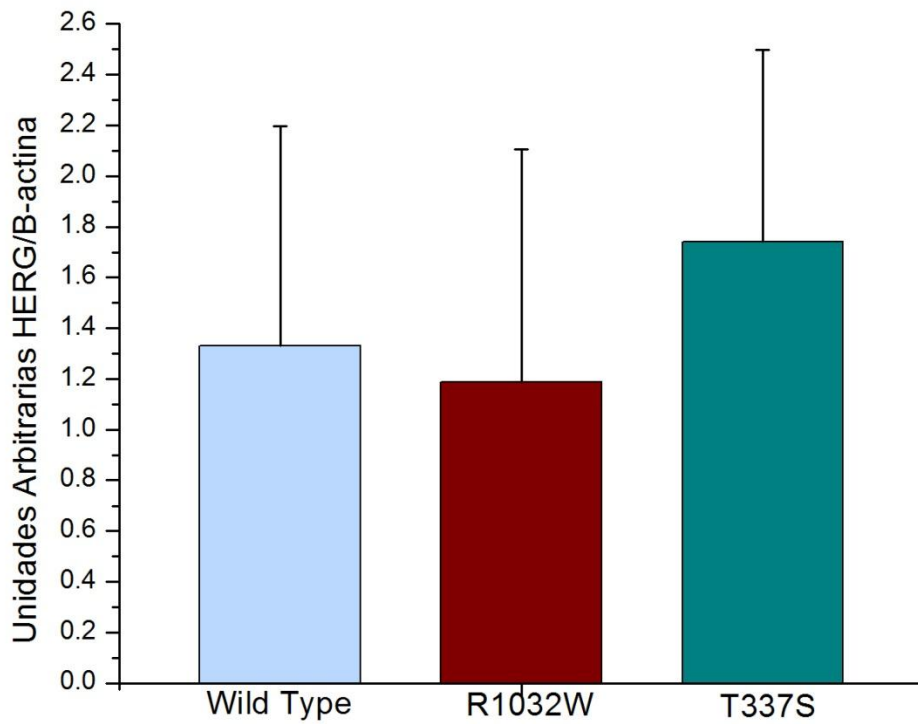


Figura #26 Expresión relativa de la proteína HERG con respecto a actina. Al normalizar la expresión de la proteína HERG con respecto a la actina no se evidencian cambios significativos en la expresión de las mutantes con respecto al canal wild type. La expresión está dada en unidades arbitrarias.

XII. DISCUSIÓN DE

RESULTADOS

Desde el inicio de la descripción molecular del canal HERG por Trudeau en 1995, sobresalió la importancia de estudiar este canal debido a la relación encontrada con la canalopatía denominada Síndrome del QT largo tipo II (Trudeau et al. 1995).

Actualmente se ha descrito que los genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A causan hasta un 75% de las mutaciones que originan el SQT, de las cuales KCNH2 contribuye en un 30% (Tester et al., 2014). El gen KCNH2, codifica para el canal de potasio HERG y origina la corriente de potasio I_{Kr} , que es parte de la fase 3 de repolarización del potencial de acción cardíaco (Ogielska E.M., 1999; Tseng G-N et al., 2000; Sanguinetti M.C. et al., 2006). Por esta razón, la identificación y el estudio del substrato genético de estas patologías, sirven para el desarrollo de tests diagnósticos o ayudan a entender la función de la proteína, siendo este último, el motivo de realizar la presente tesis.

Mediante el método de transfección, se introdujo el canal nativo de HERG y las mutaciones R1032W y T337S en la línea celular HEK 293A, junto con un gen reportero como es la proteína verde fluorescente. Con microscopía de fluorescencia pudimos percatarnos de la luz verde emitida por las células que habían expresado a la proteína verde fluorescente, además de que esto era un primer indicio que, si teníamos células expresando a la proteína verde fluorescente también teníamos una expresión de nuestras mutaciones y del canal nativo. Sin embargo, al ser una cotransfección, es decir al transfectar dos genes diferentes cada uno en su vector, no podemos asegurar que cuando se exprese una proteína la otra lo hará, además, dado que el DNA de ambas proteínas tienen longitudes diferentes, es más probable que se exprese la proteína pequeña, es decir la GFP y no el canal iónico.

Para asegurarnos de la presencia del canal en membrana realizamos una inmunofluorescencia, en la cual se puede observar en la figura # 15 en la

superposición de las imágenes que el origen del color amarillo indicado por las pequeñas flechas se origina de la superposición del marcaje en color rojo de la faloidina y el verde del Kv11.1. Esto nos indicaba que la transfección originaba la expresión del canal en membrana, tanto para el canal nativo como para las mutantes R1032W y T337S. Otro punto importante de hacer notar es la amplia expresión del canal en la zona del citoplasma, si observamos la expresión del canal mutado R1032W, observaremos que la fluorescencia verde alrededor del núcleo es mayor si la comparamos con la del canal WT o T337S. Esto nos podría indicar que el canal tiene problema de tráfico celular o de degradación pero que a pesar de ello, una parte está llegando a la membrana.

El análisis electrofisiológico de los canales de potasio nos permitió por un lado, determinar de manera funcional si los canales Kv11.1 llegaban a la membrana celular y si eran funcionales y por otro, conocer las propiedades biofísicas de dichos canales.

El análisis de los experimentos de electrofisiología nos reveló que las corrientes generadas por el canal nativo transfectado tenían una curva corriente vs voltaje con características similares a las reportadas por otros autores para la corriente HERG. Estas características son, una activación a valores umbrales de -40 mV a -30mV y un pico máximo de corriente a +20mV, una rectificación a valores de +40 mV y dependencia de tiempo y voltaje (Trudeau et al. 1995; Piper D. et al 2005; Wang S. et al., 1997). Este resultado nos asegura, que el ADN del canal no sufrió mutaciones durante el proceso de amplificación y que el canal expresado por las células HEK es viable para realizar los estudios electrofisiológicos.

Una vez que realizamos los estudios electrofisiológicos encontramos que para la mutante R1032W, había una disminución en la corriente máxima alcanzada y un corrimiento hacia valores negativos. Esta disminución en la corriente generada por el canal mutado podría ser explicada por cambios en las propiedades biofísicas del canal o por una disminución en las proteínas expresadas en membrana.

Con respecto a esta última opción, los resultados de la inmunofluorescencia sugieren un problema en el tráfico intracelular del canal, indicándonos tal vez una retención del canal en el retículo sarcoplasmico o en el aparato de Golgi debido a los procesos de transporte vesicular que sufre el canal (Ayon R. et al 2013), lo cual pudiera explicar porque hay menos canales en la membrana celular y una menor corriente. Con respecto a la primera opción, el corrimiento del grafico hacia valores negativos nos sugiere que está cambiando el proceso de activación e inactivación en estado estable del canal. Por esta razón decidimos realizar una gráfica de activación en estado estable para los tres canales de potasio, encontrando que solo en la mutante R1032W, el voltaje medio de activación del canal resultaba diferente con respecto al canal nativo y pasando de 3.05 a -11.37 mV mV. Este resultado explicaría por qué tenemos el corrimiento de la curva IV hacia voltajes más negativos.

Otras de las variables que pudieran ocasionar un cambio en la corriente del canal R1032W pero que no hemos discutido aquí por considerarlas variables controladas son: el potencial de mantenimiento de la célula, temperatura del registro, concentración del potasio en las soluciones intra y extracelular y cantidad del ADN transfectado. Otro factor que no investigamos pero que tenemos planeado realizar es analizar si hay cambios en la cinética del canal, es decir, estudiar las velocidades de paso entre los diferentes estados del canal, cerrado, abierto e inactivado.

Una vez realizado el registro electrofisiológico, decidimos determinar si existía algún cambio en la expresión de proteínas. Para ello utilizamos la técnica del Western Blot, la cual a diferencia de la inmunofluorescencia nos permite cuantificar la cantidad de una proteína de interés pero no nos da información acerca de la localización celular de la misma. La cuantificaciones que realizamos no indican cambios significativos en los niveles de expresión de los diferentes canales con respecto al canal nativo, sin embargo, en la mutación R1032W pudimos apreciar una degradación de la proteína que se evidencia en el

inmunomarcaje como una banda de peso molecular inferior al esperado (135KDa y 155 KDa).

Se han descrito mutaciones del canal HERG, las cuales afectan el transporte vesicular de la proteína hacia la membrana, como los trabajos realizados por Hayashi y Lian en 2002 y 2010 respectivamente, donde encontraron que un tráfico anómalo de la proteína en las mutantes de HERG G572R y E637K, conducían a una menor expresión de canales en membrana y originaban una disminución de la corriente, siendo esto posible para la mutante R1032W.

Existe una disminución de la expresión de la proteína madura y esto a su vez ocasiona la disminución en la densidad de la corriente. Sin embargo el proceso exacto por el cual la proteína es retenida en el retículo endoplásmico aún no es conocido. Algunos autores como Li et al. en 2010, proponen la interacción reciproca de dos chaperonas como lo son la Hsp 70 y la Hsc70. Wang y colaboradores en 2012, mencionan que algunas mutantes del canal HERG pueden ser retenidas por el retículo endoplásmico en donde son asociadas fuertemente a calnexina y calreticulina para después ser degradadas por la vía ubiquitina-proteosoma. (Li P., et al., 2010; Wang Y., et al. 2012.)

Una vía alternativa de transporte de la proteína HERG es a través de pequeñas GTPasas, las cuales según el estudio de Delisle del 2009, la proteína HERG y el canal HCN cuentan con una regulación distinta a la mayoría de las proteínas de membrana. La GTPasa Sar 1 ayuda en el transporte hacia el retículo endoplásmico, mientras que ARF1 regula el tráfico de proteínas hacia el aparato de Golgi y el reciclado de proteínas por endosomas es regulado por Rab6 y Rab11, las cuales previenen la reexpresión de proteínas a la membrana después de haber sido internalizadas, siendo cualquiera de estos factores, el que podría estar modificado y por lo tanto tener problemas de tráfico de la proteína (Delisle et al., 2009).

O bien, podría deberse a procesos de degradación de la proteína, como han sido descritas por Gong Q. en el 2005, por lo tanto podríamos proponer un estudio por

separado de la proteína de membrana o madura y de la proteína no glucosilada o inmadura, además de ARNm de cualquier chaperona participante en el proceso de tráfico de la proteína HERG (Gong et al., 2005).

Mientras tanto, en la mutante T337S, los registros electrofisiológicos no arrojaron cambios significativos, indicándonos que la mutación no afectaba la función del canal, al igual que el western blot donde pudimos encontrar las dos bandas que han sido descritas para el canal de potasio HERG, en sus pesos moleculares correspondientes.

Como conclusión final podemos decir que la mutación R1032W podría originar una disminución de la densidad de la corriente debido a retención o degradación de la proteína y a su vez en una persona, la disminución de la densidad de la corriente podría originar una prolongación de la repolarización cardíaca, originando un alargamiento del potencial de acción y la predisposición para arritmias como Torsade de Pointes o CPVT.

XIII. CONCLUSIONES

- 1. La mutación R1032W causa una disminución en la densidad de la corriente de cerca un 30% con respecto al canal nativo.**
- 2. El cambio en la densidad de la corriente podría ser debido a una retención de la proteína en el retículo endoplásmico o por degradación ligada a la vía de ubiquitin-proteosoma.**
- 3. La disminución en la densidad de la corriente de la mutante R1032W, originaria una disminución de la corriente I_{Kr} , originando un alargamiento del potencial de acción, lo cual predispone al padecimiento del Síndrome del QT largo.**
- 4. La mutación T337S, no produce cambios electrofisiológicos significantes.**

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackerman MJ.1998. The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin Proc.* 73 :250-69.
2. Armstrong C. 1998. Voltage-Gated Ion Channels and Electrical Excitability. *Neuron*, Vol. 20, 371–380.
3. Ayon R. 2013. Mutant hERG channel traffic jam. Focus on “Pharmacological correction of long QT-linked mutations in KCNH2 (hERG) increases the trafficking of Kv 11.1 channels stored in the transitional endoplasmic reticulum”. *American Physiological Society.* 305: C916-C918.
4. Behr E. R. 2008. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *European Heart Journal*, 29, 1670–1680.
5. Campuzano O. 2010. Genetics and cardiac channelopathies. *Genetics in Medicine*, Volume 12, Number 5.
6. Crotti L. 2013. Long QT Syndrome–Associated Mutations in Intrauterine Fetal Death. *JAMA.* 309, 14.
7. Cui J. 2001. Analysis of the Cyclic Nucleotide Binding Domain of the HERG Potassium Channel and Interactions with KCNE2. *J. Biol. Chem.* 276:17244-1725.
8. Curran M.E. 1995. A Molecular Basis for Cardiac Arrhythmia: HERG Mutations Cause Long QT Syndrome. *Cell*, Vol. 80, 795-803.
9. Delisle B. 2009. Small GTPase Determinants for the Golgi processing and Plasmalemmal Expression of Human Ether-a-go-go Related (hERG) K⁺ Channels. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 284, Num 5, pp 2844-2853.
10. Dobrzynski H. 2013. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacology & Therapeutics* 139, 260–288.
11. Elinder F. 2007. On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiology & Behavior* 92 ,1–7.
12. Ficker E. 2003. Role of the Cytosolic Chaperones Hsp70 and Hsp90 in Maturation of the Cardiac Potassium Channel hERG. *Circ Res*; 92:e87-e100.
13. Gianulis E.C. 2011. Rescue of Aberrant Gating by a Genetically Encoded PAS (Per-Arnt-Sim) Domain in Several Long QT Syndrome Mutant Human Ether-á-go-go-related Gene Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 286, Num. 25, pp. 22160–22169.
14. Go AS. 2014. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 129 (3):e28-e292.
15. Gong Q. 2002. Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H77-H84.
16. Gong Q. 2005. Degradation of Trafficking-defective Long QT Syndrome Type II Mutant Channels by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* 280:19419-19425.
17. Gong Q. 2010. Alternative Splicing and Polyadenylation Contribute to the Generation of hERG1 C-terminal Isoforms. *J Biol Chem.* 285(42): 32233–32241.

18. Grant A. 2009. Cardiac Ion Channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2:185-194.
19. Hille B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes.* 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates.
20. Hille. B.1977. Ionic Channels in Excitable Membranes. *BIOPHYS. J.* Vol. 22.
21. Horie M, Hayashi S, Kawai C.1990. Two types of delayed rectifying K₊ channels in atrial cells of guinea pig heart. *Jpn J Physiol* 40: 479–490.
22. Hsiao Pi Yin, 2013. Gene mutations in cardiac arrhythmias: a review of recent evidence in ion channelopathies. *The application of Clinical Genetics*, 2013;6 1–13.
23. Itoh T. 1998. Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum Genet.*102:435–439.
24. Kaplan WD, Trout WE.1969. The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* 61: 399–409.
25. Kapplinger JD. 2009. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION® long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm.* 6(9): 1297–1303.
26. Kim J-B. 2014. Channelopathies. *Korean J Pediatr.* Vol. 57(1):1-18.
27. Li P., 2010. Reciprocal Control of hERG Stability by Hsp70 and Hsc70 With Implication for Restoration of LQT2 Mutant Stability. *Circ Res.* 2011;108:458-468.
28. Liu M. 2004. Protein domains correlate strongly with exons in multiple eukaryotic genomes – evidence of exon shuffling?. *TRENDS in Genetics* Vol. 20 No.9.
29. Liu W-X. 2014. Identifying the Subfamilies of Voltage-Gated Potassium Channels Using Feature Selection Technique. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12940 - 12951.
30. Lu Yu. 2001. Effects of premature stimulation on HERG K⁺ channels. *Journal of Physiology*, 537.3, pp.843–851.
31. Lu Z. 2002. Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol.* 120(5):663-76.
32. MacKinnon R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417: 515–522.
33. MacKinnon R. 2003. Potassium channels. *FEBS Letters* 555, 62-65.
34. Nerbonne J. 2005. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev* 85: 1205–1253.
35. Nerbonne J. 2005. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev* 85: 1205–1253.
36. Ogielska E.M. 1999. Functional Consequences of a Decreased Potassium Affinity in a Potassium Channel Pore Ion Interactions and C-Type Inactivation. *J. Gen. Physiol.* © The Rockefeller University Press, Vol 113.
37. Piper D. 2005. Regional Specificity of Human *ether-a'-go-go*-related Gene Channel Activation and Inactivation Gating. *J. Biol. Chem.*, 280:7206-7217.
38. Priori SG. 2004. Inherited arrhythmogenic diseases: the complexity beyond monogenic disorders. *Circ Res.* 94:140-5.
39. Rasmusson R. 1998. Inactivation of Voltage-Gated Cardiac K⁺ Channels. *Circ Res.* 82: 739-750.

40. Sanguinetti M. 1995. A Mechanistic Link between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG Encodes the IKr Potassium Channel Cell, Vol. 81,299-307.
41. Sanguinetti M. C. 2006. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. NATURE, Vol. 440, 23.
42. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK.1990. Two components of cardiac delayed rectifier K current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. J Gen Physiol 96:195–215.
43. Schimpf R.2008. Clinical and molecular genetics of the short QT syndrome. Curr Opin Cardiol 23:192–198.
44. Schmitt N. 2014. Cardiac Potassium Channel Subtypes: New Roles In Repolarization and Arrhythmia. Physiol Rev 94: 609–653.
45. Shiem C. 2000.Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. Pharmacological Reviews. 52:557–593.
46. Smith PL. 2002. Fast and Slow Voltage Sensor Movements in HERG Potassium Channels. J. Gen. Physiol. Vol.119, 275–293.
47. Snyders D. J. 1999. Structure and function of cardiac potassium channels. Cardiovascular Research 42, 377–390.
48. Stanley N. 2008. Delayed-rectifier potassium currents and the control of cardiac repolarization: Noble and Tsien 40 years after. J Physiol 586.24 pp 5849–5852.
49. Subramanyam P. 2014. Ion Channel Engineering: Perspectives and Strategies. J. Mol. Biol. xx, xxx–xxx.
50. Tamargo J. 2004. Pharmacology of cardiac potassium channels. Cardiovascular Research, Vol. 62, 9 – 33.
51. Tester D. 2005. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. Heart Rhythm. Vol. 2. Issue 5. Pages 507-517.
52. Tester D. J.2014. Genetics of long QT Syndrome. Methodist DeBaKey Cardiovascular Journal 10, 1.
53. Thermann R. 1998. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. The EMBO Journal Vol.17 No.12 pp.3484–3494.
54. Trudeau M.C. 1995. HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family. SCIENCE Vol. 269.
55. Tseng G-N. 2000. IKr: The hERG Channel. J Mol. Cell Cardiol. 33, 835–849.
56. Vandenberg J. 2012. hERG K⁺ channels: structure, function and clinical significance. Physiol Rev 92: 1393–1478.
57. Walker V.E. 2010. Hsp40 Chaperones Promote Degradation of the hERG Potassium Channel. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 285, NO. 5, pp. 3319–3329.
58. Wang S. 1997. A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in Xenopus oocytes. Journal of Physiology, 502.1, pp.45-60.
59. Wang Y., et al. 2012. Trafficking- Deficient G572R-hERG and E637K-hERG Activate Stress and Clearance Pathways in Endoplasmic Reticulum. January, Volume 7, Issue 1, e29885

60. Warmke J. 1994. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Neurobiology*. Vol. 91, pp. 3438-3442,.
61. Warmke J. Ganetzky B. 1994. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 12;91, 8:3438-42.
62. Xu H. 1999. Four Kinetically Distinct Depolarization-activated K1 Currents in Adult Mouse Ventricular Myocytes. *J. Gen. Physiol.* Volume 113, 661–677.
63. Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*; 419:35– 42.
64. Zhang J. 1998. Intron function in the nonsense-mediated decay of b-globin mRNA: Indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA Society*, 4:801–815.