



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Departamento de Bioquímica

**Regulación de canales  $K_v4$  por subunidades  
beta accesorias**

**ÁNGELA PRIETO FOLGADO**

**Madrid 2017**

**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Regulación de canales Kv4 por subunidades  
beta accesorias**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

**ÁNGELA PRIETO FOLGADO**  
**Licenciada en Biología**

Bajo la dirección de:

Dra. Carmen Valenzuela Miranda  
Dra. Teresa González Gallego

Realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols

**Madrid 2017**

El trabajo descrito en la presente Tesis Doctoral ha sido llevado a cabo en el departamento de modelos experimentales de enfermedades humanas del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM) y ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

Modulación adrenérgica de los canales Kv1.5-Kv $\beta$ 1.3 expresados en diferentes tipos de células cardiovasculares. CICYT (SAF2010- 14916) 2011-2014. Investigador principal: Carmen Valenzuela Miranda.

Red de Investigación Cardiovascular. FIS (RD12/0042/0019). 2012-2014. Investigador principal: Carmen Valenzuela Miranda.

Además, la realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI), del Ministerio de Economía y Competitividad.

A Sergio y Alysa,  
el motor de mi existencia,  
mi razón de ser,  
mis ganas de vivir.

Es verdad, pues: reprimamos  
esta fiera condición,  
esta furia, esta ambición,  
por si alguna vez soñamos.  
Y sí haremos, pues estamos  
en mundo tan singular,  
que el vivir sólo es soñar;  
y la experiencia me enseña,  
que el hombre que vive, sueña  
lo que es, hasta despertar.

[...]

¿Qué es la vida? Un frenesí.  
¿Qué es la vida? Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño;  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son.

“La vida es sueño”, 1635.  
Pedro Calderón de la Barca

## **Agradecimientos**

Madre mía, me parece increíble que este escribiendo los agradecimientos de mi Tesis Doctoral, en ocasiones pensé que este momento no llegaría. Han pasado 15 años desde que mi profesora de biología del instituto me explicara aquello de las leyes de Mendel con sus guisantes y sus genes dominantes y recesivos... Siempre me había gustado la ciencia pero desde ese momento me fascinó hasta tal punto que supe que quería dedicarme a ello. El camino durante estos años no ha sido fácil, pero a día de hoy, puedo decir que ha merecido la pena. Me acuerdo cuando mi prima Almudena anunció que quería estudiar Biología y al año siguiente yo comuniqué a la familia que quería estudiar lo mismo. Recuerdo que nos decían “para dos universitarias que hay en la familia y estudian lo mismo, deberías estudiar medicina alguna, que hay que tener un médico en la familia”. Por supuesto ninguna hicimos caso de sus “sabios” consejos. Hoy en día mi prima es una Doctora en Biología y Policía Nacional (las vueltas que da la vida primita) y yo estoy a punto de leer mi Tesis.

Los años en la Facultad me sirvieron, además de para aprender a jugar al mus, para entender qué era esto de la biología y para decidir que mi campo era la investigación. Tras un Máster, una primera experiencia investigadora poco agradable y algún palo que otro, un día acabé haciendo una entrevista en el laboratorio de la Dra. Carmen Valenzuela. Recuerdo aquél primer momento como si fuera hoy. Ella trataba de explicarme en qué consistía eso de la electrofisiología y yo hacía auténticos esfuerzos por tratar de entenderlo. No era sencillo, era completamente distinto a lo que estaba acostumbrada y eso fue lo que me atrajo.

Han pasado 6 años desde aquél día. Han sido años muy duros para mí, en los que he madurado mucho a nivel profesional y personal. Durante estos años he entendido aquello que dicen las abuelas de que “la salud es lo más importante”. Nadie debería vivir con dolor continuo. Mis problemas de salud me han hecho perderme muchas cosas. Me hubiera gustado haber aprovechado estos años mucho más, me han faltado muchas experiencias por vivir, lugares que conocer, técnicas que aprender... Pero si hay algo que he aprendido durante este tiempo es a aprovechar lo que la vida nos da, a disfrutar de los pequeños momentos y a ver siempre el lado positivo de las cosas. Me quedo con lo bueno, y es que a día de hoy, estoy bien y acabando mi Tesis. Y por supuesto me quedo con todas las personas que me han acompañado en este viaje.

Lo primero que quiero es agradecer a la Dra. Alicia Hernández porque hasta que no caí en sus manos no empecé a ver la luz al final del túnel, hiciste posible mi recuperación. A la Dra. Laura García Bernardo, porque gracias a ella hoy tengo a mi niña en brazos y, a la Dra. Izaskún Méndez por traerla al mundo en una cesárea un poco complicada. Gracias a vosotras hoy soy madre y aunque no curada, sí estoy sana y preparada para seguir adelante.

A ti, Carmen, por TODO. Por ser no solo una gran profesional sino por encima de todo, una gran persona. Por dejarme entrar en tu laboratorio, por enseñarme con esa pasión y por transmitirme el respeto por este trabajo. Pero sobre todo, por tu apoyo incondicional, por tu paciencia, tu cariño, tu empatía, por ponérmelo tan fácil siempre. No sé cómo agradecerle todo lo que has hecho por mí. Me siento muy afortunada de haber trabajado contigo. Mil gracias Carmen. También a la Dra. Teresa González por transmitirme sus conocimientos y su pasión por la ciencia en general, y la electrofisiología en particular. Gracias a las dos por hacer posible esta Tesis.

¿Y qué hubiera sido de mí sin mis compis de labo? Aún recuerdo cuando llegué el primer día y me enfrenté a un equipo de *Patch* y ahí estaban los veteranos, Cris y Álvaro (alias El Lechón) para explicarme cómo funcionaba aquello. Gracias chicos por aceptarme como a una más, por transmitirme todo lo que sabíais y por vuestra paciencia. Gracias a mi compañera Alicia, mi amiga, por tu apoyo y tu ayuda incondicional, siento no haber podido estar estos últimos tiempos para ayudarte más. Recuerdo con mucho cariño las tardes de *Patch Clamp* amenizado con risas, música y lo que se nos ocurriera, parecía mentira que estuviéramos trabajando. Formábamos un gran equipo los cuatro, ¿verdad? Espero que sigamos manteniendo el contacto y que consigáis todos vuestros propósitos. Un besazo chicos.

Por supuesto a Diego, me hubiera gustado conocerte mejor, muchas gracias por ayudarme en los momentos en los que yo no podía estar ahí. No quiero que se me olviden el resto de personas que han pasado por el labo como Ulyana, Carmen y Mariela... de todos ellos me llevo algo. También del resto de compañeros del IIB: Mario, Antonio, Eva, María, Marina, José... con los que he compartido comidas, cafés al sol y momentos de desahogo mutuo, porque esto de la ciencia no es fácil y hay días en que los experimentos no salen.

Tengo que hacer una especial mención al Dr. Lisardó Boscá ya que como Director del Centro hizo todo lo posible para facilitarme las cosas cuando mi salud me impedía desarrollar mi trabajo con normalidad. A Lucía y Adela por todo el papeleo que las he obligado a hacer y por hacerlo siempre con una sonrisa. En general a todo el personal del CSIC que me ha dado la oportunidad de, pese a todo, poder estar aquí hoy.

Al Dr. José Ramón Naranjo por introducirme en el maravilloso mundo de los sueños y dejarme formar parte de su investigación y a la Dra. Marta Gutiérrez por prestarme las herramientas para llevarlo a cabo y ayudarme con la química, que ya sabemos que no es mi fuerte.

A mis padres, gracias por haberme dado la oportunidad de formarme y la libertad para crecer como persona. Gracias a vosotros estoy hoy aquí. A mi hermano Raúl, mi canijo de 1.80, aún recuerdo cuando venías a buscarme mientras estudiaba porque querías jugar con la tata, cuánto has crecido. A mis yayos, Ángelita y Florentino, por darnos siempre todo incondicionalmente, te echo de menos abuelo. A mi abuela Antonia por muchos buenos recuerdos de mi infancia. A mi tía Rosi, a la que perdí por el



Camino y a la que recuerdo cada día, dejaste un hueco enorme tía. A mi tía Rosa, esa cincuentona adolescente (no te enfades tía), por apoyarme siempre que lo he necesitado y por haber criado a esos hijos tan estupendos. A mi prima Almu, la otra científica de la familia, por ser mi amiga y estar siempre ahí. Al resto de tíos y primos por formar parte de mi vida.

Por supuesto, a la familia que no se elige, a mi amiga Patri, a su marido y a su hijo por ser mi familia, apoyarme, darme ánimo y fuerza para seguir siempre, de manera incondicional. Te quiero chata y estoy deseando que llegue el nuevo pequeño para aumentar tu bonita familia. Espero que nuestra amistad dure al menos otros 30 años más.

A mi familia política, a Mon y Marimar, por ser cómo son, por estar siempre, sin condiciones, ayudando en todo momento y por tratarme desde el principio como a una más. Gracias Mon por interesarte siempre por lo que hago. Gracias Mari, no sé cómo habríamos sobrevivido sin tus *tuppers*. A Laura, mi cuñada, gracias a que estás ahora cuidando de la niña yo puedo estar escribiendo estas líneas, gracias por ser tan paciente y por preocuparte por nosotras. A Diego y a Cris, mis tíos postizos, por ayudarnos siempre que lo hemos necesitado.

Dejo para el final a las personas más importantes de mi vida, Sergio y Alysa, mis pilares. Gracias cariño por estar siempre ahí, por entenderme, apoyarme, animarme, por secarme las lágrimas tantas veces y darme fuerza siempre para levantarme, por ser mi gran apoyo y por quererme pese a todo. Sin ti no lo habría conseguido. Gracias por formar junto a mí esta maravillosa familia. No tengo palabras suficientes para hacerte saber cuánto te lo agradezco. Esta Tesis es tan tuya como mía. Por último gracias a Alysa, mi niña, mi vida, mi princesa. Gracias por llegar a nuestras vidas. Jamás imaginé que una cosita tan pequeña pudiera llenar tanto nuestras vidas. Haces que cada día sea una aventura. Sólo con una sonrisa haces que todo haya valido la pena. Poder ser tú mamá es lo mejor que me ha pasado. Solo espero que algún día leas esto y te sientas tan orgullosa de mí como yo lo estaré de ti siempre. OS QUIERO.

Los canales de potasio regulados por voltaje ( $K_V$ ) son proteínas de membrana que juegan diversos papeles fisiológicos en tejidos excitables y no excitables. Estos canales son esenciales para generar potenciales de acción en el sistema nervioso central y, cuando están defectuosos, dan lugar a enfermedades tales como las arritmias cardíacas y la epilepsia. Debido a esto, tienen una gran relevancia farmacológica.  $K_V4.3$  pertenece a los  $K_V$  y es uno de los responsables de la génesis de la corriente transitoria de salida de potasio ( $I_{to}$ ) expresada en miocitos cardíacos y de la corriente somatodendrítica de potasio de tipo A ( $I_{SA}$  o  $I_A$ ) en neuronas. Aunque la corriente producida por las subunidades  $\alpha$  de  $K_V4.3$  muestra propiedades biofísicas similares a las de la corriente  $I_{to}$  nativa, existen diferencias. Los canales  $K_V4.3$  nativos necesitan subunidades auxiliares que modulan sus propiedades biofísicas y su tráfico a membrana. La proteína de interacción con canales  $K_V 2$  (KChIP2) modifica las propiedades de los canales  $K_V4.3$  y es abundante en corazón. KChIP2 es necesaria para generar la corriente  $I_{to}$  cardíaca. Se ha observado una disminución en los niveles de expresión tanto de proteína como de mRNA de KChIP2 en diversas enfermedades cardíacas, tales como la hipertrofia, fallo cardíaco, infarto de miocardio, fibrilación auricular o en la cardiomiopatía diabética. KChIP3, también conocida como DREAM o calsenilina, es una proteína multifuncional perteneciente a la subfamilia de sensores neuronales al calcio, con funciones específicas según el compartimento celular. En el núcleo, KChIP3 actúa como un represor de la transcripción dependiente de  $Ca^{2+}$ . Fuera del núcleo, interactúa con presenilinas o con canales  $K_V4$  para modular la liberación de calcio del retículo o el *gating* y el tráfico de los canales, respectivamente. KChIP3 se expresa mayoritariamente en el SNC, principalmente en hipocampo. Se han relacionado las alteraciones en la expresión de DREAM con varias patologías neuronales tales como ataxia, epilepsia o enfermedades neurodegenerativas. Estudios previos han demostrado que KChIP3 se expresa a la baja en modelos murinos de enfermedad de Huntington, así como en pacientes con enfermedad de Huntington (HD). En la presente Tesis Doctoral hemos considerado que esta baja expresión de KChIP3 está asociada a un mecanismo de neuroprotección endógeno en HD. Hemos analizado los efectos de Repaglinida y CL-888 sobre las corrientes generadas por los canales  $K_V4.3$ ,  $K_V4.3$ -KChIP2 y  $K_V4.3$ -KChIP3. Nuestros resultados demuestran que la unión de Repaglinida o CL-888 a KChIP2 y KChIP3 contrarresta los efectos de estas subunidades reguladoras sobre las corrientes de potasio, reduciendo la amplitud del pico y acelerando la cinética de inactivación. Además, la Repaglinida es más selectiva y presenta mayor afinidad que el CL-888 por KChIP2 y KChIP3. Nuestros resultados sugieren que la Repaglinida es capaz de unirse a KChIP2 y KChIP3 y bloquear su interacción con el canal. Así, la Repaglinida potencia el papel neuroprotector de KChIP3 en la enfermedad de Huntington, puesto que impide su actividad. Al mismo tiempo, la Repaglinida inhibe KChIP2. Esta falta de selectividad hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos igualmente eficaces, pero más selectivos frente a KChIP3.

Voltage-gated potassium channels ( $K_V$ ) are membrane proteins that play diverse physiological roles in both excitable and non-excitable tissues. These channels are essential for the generation of action potentials both in the central nervous system and in the heart. When defective, these channels can be linked to severe familial diseases including cardiac arrhythmias and epilepsy. Because of this, they are of high pharmacological relevance.  $K_V4.3$  belongs to the  $K_V$  family and is one of the channels responsible for the transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) expressed in cardiac myocytes, and the neuronal somatodendritic A-type  $K^+$  current ( $I_{SA}$  or  $I_A$ ) in neurons. Although the currents carried by  $K_V4.3$   $\alpha$ -subunits show similar biophysical properties to native  $I_{to}$ , there are some differences between them. The native  $K_V4.3$  channel needs auxiliary protein subunits to modulate its biophysical properties and trafficking. Several  $K_V$  auxiliary subunits have been identified.  $K_V$ -channel interacting proteins 2 (KChIP2) is a functional modifier of  $K_V4.3$  channel and particularly abundant in the heart. KChIP2 is required for the generation of native  $I_{to}$ . The downregulation of KChIP2 protein and mRNA levels has been observed in many heart diseases, such as cardiac hypertrophy, heart failure, myocardial infarction, heart valve disease, atrial fibrillation and diabetic cardiomyopathy. Another regulatory subunit, KChIP3, also known as DREAM or calsenilin, is a multifunctional protein of the neuronal calcium sensor subfamily with specific roles in different cell compartments. In the nucleus, KChIP3 acts as a  $Ca^{2+}$ -dependent transcriptional repressor. Outside the nucleus, it interacts with presenilins or  $K_V4$  potassium channels, to modulate calcium release from the endoplasmic reticulum or channel gating and trafficking, respectively. KChIP3 is strongly expressed in brain, specifically in the hippocampus. Alterations in KChIP3 expression are related with several neuronal disorders as ataxias, epilepsy and neurodegenerative diseases. Previous studies show that levels of KChIP3 are reduced in murine models and in patients with Huntington disease (HD). In the present Doctoral Thesis, we consider that the downregulation of KChIP3 is associated with endogenous neuroprotection in HD. We analyzed the effects of Repaglinide and CL-888 on the current generated by  $K_V4.3$ ,  $K_V4.3$ -KChIP2 and  $K_V4.3$ -KChIP3 channels. Our results show that binding of Repaglinide or CL-888 to KChIP2 and KChIP3, counteracted the effect of these subunits on potassium currents, reducing peak current amplitude and accelerating inactivation kinetics. In addition, Repaglinide is more selective and has greater affinity than CL-888 for KChIP2 and KChIP3. Our results suggest that Repaglinide is able to bind KChIP2 and KChIP3 and blocks their interaction with the channel. Thus, Repaglinide enhances neuroprotective role of KChIP3 in Huntington disease, through a blockade of its activity. At the same time, Repaglinide can inhibit KChIP2 favoring the appearance of cardiac alterations in these patients. In conclusion, identification of KChIP3-binding molecules with greater affinity and selectivity might improve therapeutic effectiveness in delaying disease onset and ameliorating symptoms in HD patients.

**Contenido**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. CANALES IÓNICOS.....	3
1.2. CANALES DE POTASIO REGULADOS POR VOLTAJE.....	4
1.2.1. Estructura de los canales de potasio regulados por voltaje.....	5
1.2.2. Poro iónico y filtro de selectividad.....	6
1.2.3. Sensor de voltaje de los canales $K_v$ .....	8
1.3. SUBUNIDADES REGULADORAS DE LOS CANALES $K_v$ .....	9
1.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES $K_v4.3$ .....	10
1.5. PROTEÍNAS DE INTERACCIÓN CON CANALES $K_v$ : KChIPs.....	13
1.5.1. Características de KChIP2.....	15
1.5.2. Características de KChIP3.....	17
1.6. PAPEL FISOLÓGICO DE LA CORRIENTE CARDÍACA TRANSITORIA DE SALIDA DE POTASIO ( $I_{to}$ ).....	18
1.7. PAPEL FISOLÓGICO DE LA CORRIENTE NEURONAL DE TIPO A ( $I_A$ o $I_{SA}$ ).....	19
1.8. FARMACOLOGÍA DE LOS CANALES $K_v4.3$ .....	20
1.9. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON Y CANALES DE POTASIO.....	21
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES.....	29
3.1.1. Características de las células CHO.....	29
3.1.2. Cultivos celulares de células CHO.....	29
3.1.3. Transfección en células CHO.....	29
3.1.4. Línea celular estable para $K_v4.3$ -KChIP2c.....	30
3.2. ELECTROFISIOLOGÍA.....	30
3.2.1. Técnica de fijación de voltaje en parches de membrana ( <i>Patch-Clamp</i> ).....	30
3.2.2. Soluciones empleadas.....	33
3.2.3. Registro de las corrientes iónicas.....	33
3.2.4. Protocolos experimentales y análisis de los datos.....	34
3.3. COMPUESTOS EMPLEADOS.....	36
3.3.1. Glibenclamida.....	36
3.3.2. CL-888.....	36
3.3.3. Repaglinida.....	37

3.3.4. Compuestos sintéticos derivados del CL-888.....	38
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	39
<b>4.RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS CANALES $K_v4.3$ .....	43
4.2. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP2.....	45
4.3. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3.....	46
4.4. SELECTIVIDAD DE REPAGLINIDA Y CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 Y $K_v4.3$ -KChIP3.....	49
4.5. EFECTOS DE REPAGLINIDA SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 Y $K_v4.3$ -KChIP3.....	54
4.5.1. Efectos de Repaglinida sobre la cinética de activación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3 .....	57
4.5.2. Efectos de Repaglinida sobre dependencia de voltaje de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3 .....	58
4.5.3. Efectos de Repaglinida sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3 .....	61
4.6. EFECTOS DE CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 Y $K_v4.3$ -KChIP3. ....	62
4.6.1. Efectos de CL-888 sobre la cinética de activación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3 .....	65
4.6.2. Efectos de CL-888 sobre dependencia de voltaje de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3 .....	67
4.6.3. Efectos de CL-888 sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3 .....	69
4.7. EFECTOS DE LA GLIBENCLAMIDA SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3 .....	71
4.5. EFECTOS DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3.....	71
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
5.1. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3... ..	75
5.2. EFECTOS DE REPAGLINIDA Y CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 Y $K_v4.3$ -KChIP3.....	77
5.3. PAPEL DE KChIP3 Y KChIP2 COMO POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS .....	79
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>7.REFERENCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>8.ANEXO 1: PUBLICACIONES .....</b>	<b>111</b>

8.1. PUBLICACIONES ORIGINALES.....	113
8.2. REVISIONES.....	116
8.3. PUBLICACIONES EN PREPARACIÓN .....	118

## Lista de Figuras

Figura 1. Las cuatro clases principales de canales de potasio .....	4
Figura 2. Esquema de la estructura y los dominios funcionales del extremo N-terminal de los canales $K_V$ .	5
Figura 3. Organización estructural de los dominios citoplasmáticos de los canales $K_V$ .....	6
Figura 4. Poro iónico de los canales de potasio .....	7
Figura 5. Estructura de los canales de potasio regulados por voltaje.....	8
Figura 6. Características electrofisiológicas de las variantes de <i>splicing</i> de los canales $hK_V4.3$ .....	11
Figura 7. Modelo esquemático del <i>gating</i> de los canales $K_V4$ . .....	12
Figura 8. Diagrama de barras y de cintas de la familia de proteínas KChIP.....	13
Figura 9. Estructura de los complejos $K_V4.3N$ -KChIP1.....	15
Figura 10. Características electrofisiológicas de los canales $hK_V4.3L$ -KChIP2 .....	16
Figura 11. Representación esquemática de las distintas configuraciones de la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana ( <i>patch-clamp</i> ).....	31
Figura 12. Estructura molecular de la Glibenclamida .....	36
Figura 13. Estructura molecular del compuesto CL-888.....	37
Figura 14. Estructura molecular de la Repaglinida .....	37
Figura 15. Estructura molecular de los compuestos PC240, PC220, PC255, PC246 y AM110 .....	38
Figura 16. Características electrofisiológicas de los canales $K_V4.3$ .....	44
Figura 17. Características electrofisiológicas de los canales $K_V4.3$ -KChIP2 .....	45
Figura 18. Características electrofisiológicas de los canales $K_V4.3$ -KChIP3 .....	47
Figura 19. Registros de corriente en los que se muestran los efectos de Repaglinida y CL-888 sobre los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3.....	49
Figura 20. Efectos de Repaglinida y CL-888 sobre la inhibición de la corriente generada por los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3. ....	50
Figura 21. Dependencia de concentración del bloqueo producido por Repaglinida en los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3 .....	51
Figura 22. Curvas dosis-respuesta de Repaglinida en los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3 .....	52
Figura 23. Dependencia de concentración del bloqueo producido por CL-888 en los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3 .....	53
Figura 24. Curvas dosis-respuesta de CL-888 en los canales $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3.....	53
Figura 25. Dependencia de voltaje del bloqueo inducido por Repaglinida sobre los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3$ -KChIP2 y $K_V4.3$ -KChIP3. ....	55

Figura 26. Efectos de Repaglinida sobre la aceleración de la inactivación de las corrientes generadas por $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3. ....	56
Figura 27. Corriente relativa para Repaglinida en los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	57
Figura 28. Curvas de activación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 producidas por Repaglinida.....	58
Figura 29. Efectos de Repaglinida sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	59
Figura 30. Curvas de inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 producidas por Repaglinida.....	60
Figura 31. Efectos de Repaglinida sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	61
Figura 32. Cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 para Repaglinida. ....	62
Figura 33. Dependencia de voltaje del bloqueo inducido por CL-888 sobre los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	64
Figura 34. Efectos de CL-888 sobre la cinética de inactivación de las corrientes generadas por $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3. ....	65
Figura 35. Corriente relativa para CL-888 en los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	65
Figura 36. Curvas de activación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 producidas por CL-888.....	66
Figura 37. Efectos de CL-888 sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	67
Figura 38. Curvas de inactivación de $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 producidas por CL-888.....	68
Figura 39. Efectos de CL-888 sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	69
Figura 40. Cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 y $K_{V4.3}$ -KChIP3 para CL-888 .....	70
Figura 41. Efectos de la Glibenclamida sobre los canales $K_{V4.3}$ -KChIP3.....	71
Figura 42. Efectos de compuestos derivados del CL-888 sobre los canales $K_{V4.3}$ -KChIP3 .....	72



**Lista de Tablas**

Tabla 1. Efectos de las subunidades reguladora sobre el <i>gating</i> de los canales $K_V$ .....	9
Tabla 2. Composición (mM) de las soluciones externa e interna .....	33
Tabla 3. Tiempo al pico (ms) y constante de tiempo de activación ( $T_{Act}$ ) (ms) de la corriente generada por los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ . .....	47
Tabla 4. Resumen comparativo de los valores correspondientes a la cinética de inactivación ( $\tau_{Inac,slow}$ , $\tau_{Inac,fast}$ , $T_{Inac}$ ), dependencia de voltaje de la inactivación ( $E_h$ , s) y recuperación de la inactivación ( $T_{rec}$ ) obtenidos para los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ .....	48
Tabla 5. Comparación del porcentaje de bloqueo producido por Repaglinida y CL-888 (100 nM) sobre los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ . .....	51
Tabla 6. Grado de bloqueo de los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ inducido por Repaglinida.....	56
Tabla 7. Tiempo al pico (ms) y constante de tiempo de activación ( $T_{Act}$ ) (ms) de la corriente generada por los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ ausencia y presencia de Repaglinida 1 $\mu M$ .....	57
Tabla 8. Grado de bloqueo de los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ inducido por CL-888.....	63
Tabla 9. Tiempo al pico (ms) y constante de tiempo de activación ( $T_{Act}$ ) (ms) de la corriente generada por los canales $K_V4.3$ , $K_V4.3-KChIP2$ y $K_V4.3-KChIP3$ ausencia y presencia de CL-888 100 nM. ....	66

**Índice de abreviaturas**

4-AP	4 Aminopiridina
Å	Angstrom
ATF6	Factor activador de la transcripción 6
ATP	Adenosina trifosfato
C	Estado cerrado del canal
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
CaMKII	Proteína Kinasa II dependiente de Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CGN	Neuronas granulares cerebrales
CHO	Línea celular derivada de ovario de hámster chino
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
Cm	Capacitancia de la membrana
C-terminal	Dominio carboxilo terminal de las proteínas
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPLs	Proteínas similares a dipeptidil-peptidasas
DRE	Elemento regulador corriente abajo
E.E.M.	Error estándar de la media
ER	Retículo endoplásmico
FBS	Suero fetal bovino
H	Hélice $\alpha$
HD	Enfermedad de Huntington
HEK293	Línea celular derivada de riñón de embrión humano
His	Histidina
HpTx	heteropodatoxina
Htt	Proteína hungtintina
I <sub>A</sub> o I <sub>SA</sub>	Corriente somatodendrítica de tipo A
I <sub>c</sub>	Estado cerrado inactivo del canal
I <sub>CaL</sub>	Corriente interna de calcio tipo L
I <sub>K1</sub>	Corriente rectificadora interna
I <sub>K,ACh</sub>	Corriente de potasio activada por acetilcolina
I <sub>Kr</sub>	Corriente rápida rectificadora tardía
I <sub>Ks</sub>	Corriente lenta rectificadora tardía

---

$I_{Kur}$	Corriente rectificadora tardía ultrarrápida
$I_{Na}$	Corriente interna de sodio
$I_o$	Estado abierto inactivo del canal
$I_{to}$	Corriente transitoria de salida
$K^+$	Ión potasio
$K_{ATP}$	Canal de potasio sensible a ATP
KChIP	Proteína de interacción con canales de potasio dependientes de voltaje
KDa	Kilodalton
KHz	Kiloherzio
$K_{ir}$	Canal de potasio rectificador interno
KIS	Dominio supresor de la inactivación
$K_V$	Canal de potasio dependiente de voltaje
$K_V\beta$	Subunidad auxiliar $\beta$ de los canales de potasio dependientes de voltaje
Ltk	Línea celular derivada de la leucito-tirosina kinasa de ratón
MSNs	Neuronas espinales del estriado
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
$Na^+$	Ión sodio
NCS	Sensor neuronal al calcio
NMDA	N-Metil D-Aspartato
N-terminal	Dominio amino terminal de las proteínas
O	Estado abierto del canal
$\Omega$	Ohmio
P	Lazo P
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PKG	Proteína kinasa G
QT	Intervalo QT del electrocardiograma
SUR	Receptor de sulfonilurea
$\tau$	Constante de tiempo
TEA	Tetraetilamonio
TM	Transmembrana
Trp	Triptófano
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas
VSDs	Dominios sensibles a voltaje
$Zn^{2+}$	Ión zinc

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas de membrana capaces de formar poros iónicos que pueden estar localizados en la membrana plasmática o en la membrana de orgánulos intracelulares (retículo endoplásmico, mitocondria...) de las células excitables y no excitables [1]. Cada pensamiento, percepción, movimiento o latido de nuestro corazón requiere una rápida comunicación entre células [2]. Esta señalización implica flujos eléctricos producidos cuando los canales iónicos se abren y se cierran, y es necesaria para mantener la homeostasis celular [2-4]. El equilibrio homeostático implica una alta concentración de  $\text{Na}^+$  [ $\text{Na}^+$ ] en la sangre y el medio extracelular; y una alta concentración de  $\text{K}^+$  (baja de [ $\text{Na}^+$ ] y [ $\text{Ca}^{2+}$ ]) en el citoplasma. Estos gradientes se mantienen, además, gracias a la acción de bombas y transportadores que preparan la membrana celular para el transporte pasivo de iones.

Los canales iónicos tienen dos propiedades fundamentales: permeabilidad y selectividad. Con respecto a la permeabilidad cabe destacar que cada componente de las corrientes iónicas obedece a la Ley de Ohm [3]. En cuanto a la selectividad, la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , permite la entrada selectiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a favor de gradiente electro-químico a la célula, haciendo el medio intracelular más positivo. Este aumento de cargas positivas en el interior se conoce como despolarización de la membrana y ocasiona la apertura de los canales selectivos de  $\text{K}^+$ , de manera que los iones  $\text{K}^+$  salen de la célula y restauran el voltaje hacia valores negativos (repolarización). Así es básicamente como se genera la señalización eléctrica celular [5].

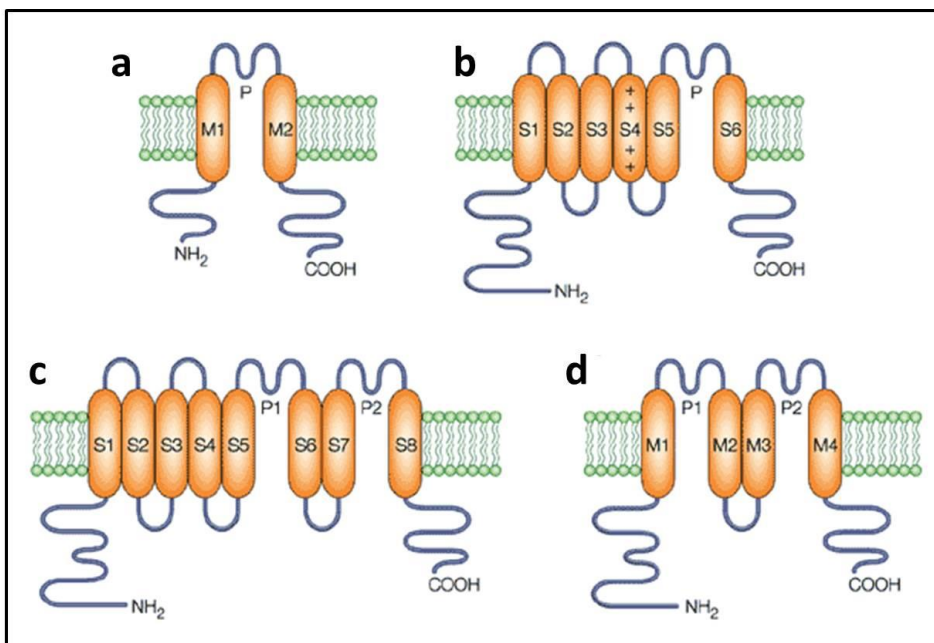
Los canales iónicos se han encontrado tanto en eucariotas como en procariotas. Se desarrollaron temprano en la evolución probablemente al servicio de tareas celulares básicas, tales como la producción de energía y la estabilidad celular osmótica, y evolucionaron para convertirse en el elemento fundamental del sistema eléctrico de los organismos [2]. Fueron reconocidos por primera vez por su participación en la generación del potencial de acción en el axón [6-9].

Debido a su ubicuidad, mutaciones en los canales iónicos están implicadas en múltiples patologías conocidas como *canalopatías*. Se han descrito *canalopatías* neurológicas como la epilepsia [10], distintos tipos de ataxias y migrañas [11]; cardíacas, es el caso de diversos tipos de arritmias como el síndrome de QT largo [12], el síndrome de QT corto [13] o el Síndrome de Brugada [14, 15]; musculares como la parálisis periódica o la miotonía congénita [16]; renales [17] e incluso epiteliales [18]. De estos datos se deduce que los canales iónicos no sólo afectan a las funciones de las células excitables. Así, por ejemplo, se ha descrito que están implicados en la activación de células inmunes como macrófagos [19, 20] y linfocitos T [21]; y en la secreción de insulina [22]. Debido a las funciones que tienen en la migración y proliferación celular, los canales iónicos están implicados en múltiples tipos de cáncer, tanto debido a mutaciones como a fallos en su regulación [23]. Todo esto hace que los canales iónicos sean potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de múltiples patologías.

Los avances tecnológicos de las últimas décadas, han hecho que los canales iónicos pasen de ser una idea a una realidad que implica estructuras, mecanismos y funciones complejas. Así que solo nos queda plantear, ¿hasta dónde llegan realmente sus implicaciones?

## 1.2. CANALES DE POTASIO REGULADOS POR VOLTAJE

Los canales de potasio regulados por voltaje ( $K_v$ ) constituyen una superfamilia proteica con más de 140 miembros, representados por unos 70 loci en el genoma de mamíferos (40 genes humanos codifican canales de potasio) [24, 25]. Hasta la fecha, se han descrito 12 familias de canales de potasio subdivididas en dos grupos filogenéticos en función de sus secuencias de aminoácidos: familias  $K_v$ 1-9 y familias  $K_v$ 10-12. El primer canal de potasio identificado vino de la clonación del gen Shaker de *Drosophila sp.*, de ahí que se le considere el miembro fundador de la familia  $K_v$ 1 [26]. Los canales de potasio permiten el flujo de iones  $K^+$  hacia el exterior celular cuando la membrana se despolariza. Este flujo de potasio es necesario para múltiples procesos celulares incluidos la regulación del volumen celular, la secreción de hormonas y la generación del potencial eléctrico en las células excitables [27]. La conducción a través de los canales de potasio se caracteriza porque es muy rápida ( $\sim 10^8$  iones/segundo) y altamente selectiva [28]. La alta selectividad de estos canales a los iones potasio está asociada con una secuencia conservada y presente en todos ellos, que se conoce como secuencia consenso (GYG), y que es el elemento central del filtro de selectividad, que evita el paso de iones  $Na^+$  y permite el de  $K^+$  a través de la membrana [29].

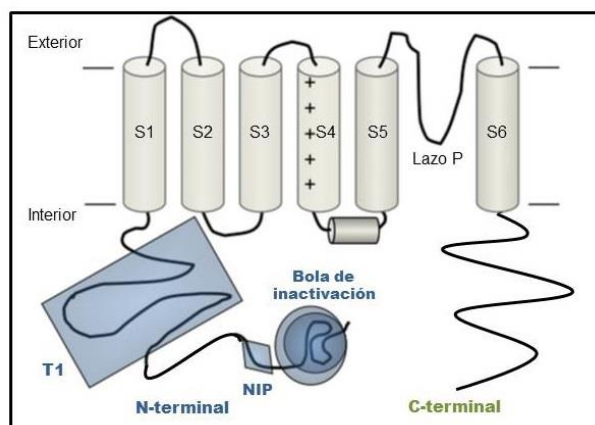


**Figura 1. Las cuatro clases principales de canales de potasio.** a. 2TM-1P (contienen 2 segmentos transmembrana (TM) unidos por un lazo P), corresponden a los canales de potasio rectificadores internos y a los bacterianos como el KcsA. b. 6TM-1P, se corresponden con la mayoría de canales regulados por voltaje. c. 8TM-2P, son híbridos de los dos anteriores. d. 4TM-2P, consisten en dos repeticiones de canales 2TM-1P, 8TM-2P y 4TM-2P que probablemente se ensamblan como dímeros para formar el canal. Tomado de Choe, 2002. [30]

Nuestro conocimiento sobre la estructura de los canales de potasio viene principalmente de un canal de la bacteria *Streptomyces lividans*, no regulado por voltaje, conocido como KcsA. Aunque la estructura de la mayoría de canales de potasio es más compleja que la del KcsA, su estudio nos ha permitido entender los mecanismos de permeabilidad, selectividad y bloqueo de los mismos [29]. Basándonos en su estructura molecular distinguimos distintos tipos de canales. La clase 2TM-1P, es la más sencilla y similar al canal KcsA, y se denomina así por tener dos hélices transmembrana(TM) unidas por un lazo P (P). Esta clase está representada por los canales de potasio que presentan rectificación interna ( $K_{ir}$ ). La clase más numerosa es la conocida como 6TM-1P cuyos canales están formados por seis hélices transmembrana (S1-S6) y un lazo P que une los segmentos S5 y S6. En esta clase se incluyen los canales de potasio ( $K_v$ ). Por último tenemos dos clases minoritarias: la 8TM-2P que es un híbrido entre las dos anteriores y la 4TM-2P, también conocidos como canales de fuga, que son diana de diversos anestésicos (Figura 1) [30, 31].

### 1.2.1 Estructura de los canales de potasio regulados por voltaje.

Los canales  $K_v$  están formados por tetrámeros de subunidades  $\alpha$  que pueden ser iguales o distintas (homo o heterotetrámeros) [32]. Cada subunidad  $\alpha$  contiene seis hélices transmembrana (S1-S6) con los extremos amino y carboxi-terminal localizados intracelularmente (Figura 2). Las hélices S5 y S6 junto con el bucle P que las une, constituyen el poro iónico del canal; mientras que las hélices S1-S4 forman el sensor de voltaje del mismo [31, 33, 34].

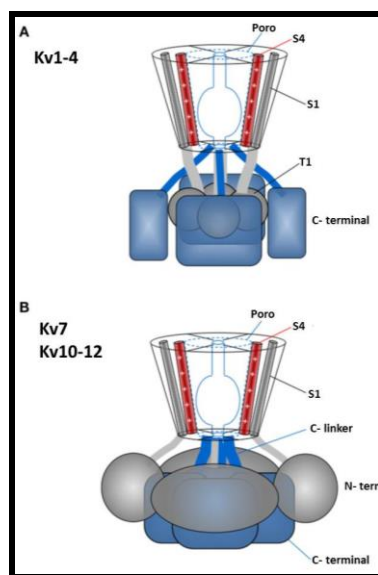


**Figura 2. Esquema de la estructura y los dominios funcionales del extremo N-terminal de los canales  $K_v$ .** Se muestran los seis segmentos transmembrana (S1-S6) con sus extremos N y C-terminal localizados hacia el citoplasma. Los segmentos S5 y S6 están unidos por el lazo P. El segmento S4 contiene cargas positivas. En el extremo amino terminal se incluye: la "bola de inactivación" responsable de la inactivación de tipo N, el dominio NIP que evita esta inactivación rápida y el dominio T1 de tetramerización con otras subunidades  $\alpha$ . Modificado de Barros et al, 2012. [37]

Para formar un canal funcional es necesario el ensamblaje de cuatro subunidades  $\alpha$ . Para ello, los canales de las familias  $K_v1$ -  $K_v4$  tienen en su extremo amino terminal un dominio conocido como "dominio de tetramerización" o dominio T1, que permite el ensamblaje entre las cuatro subunidades (Figura 2). El dominio T1 consta de ~130 aminoácidos que preceden al primer segmento transmembrana (S1). Especialmente, los dominios T1 de las cuatro subunidades se localizan por debajo del núcleo central del canal y se unen a él por medio de cuatro conectores, manteniendo los extremos carboxi-terminal localizados hacia la periferia (Figura 3). De esta manera proporciona la estabilidad necesaria para el funcionamiento del canal. Parece ser que el dominio T1 también podría actuar como un lugar de

anclaje a subunidades reguladoras. Por el contrario, los canales de las familias Kv7 y Kv10- Kv12 no tienen dominio T1, pero presentan un dominio carboxi-terminal localizado en el núcleo central del canal que podría desempeñar una función similar a la del dominio T1 [25, 35-37].

Algunos canales de potasio presentan en el extremo más distal del amino terminal un dominio denominado “bola de inactivación” que es capaz de taponar físicamente el poro del canal durante la inactivación del mismo. Este dominio inactivante consta de ~ 30 aminoácidos unidos al dominio T1 a través de un *linker* y, el proceso que lleva a cabo se conoce como inactivación de tipo N. También se ha descrito la existencia de un dominio para prevenir la inactivación de tipo N (NIP) que está localizado entre el dominio T1 y la bola de inactivación, aunque el mecanismo por el cual evita la inactivación aún no está claro (Figura 2) [31].



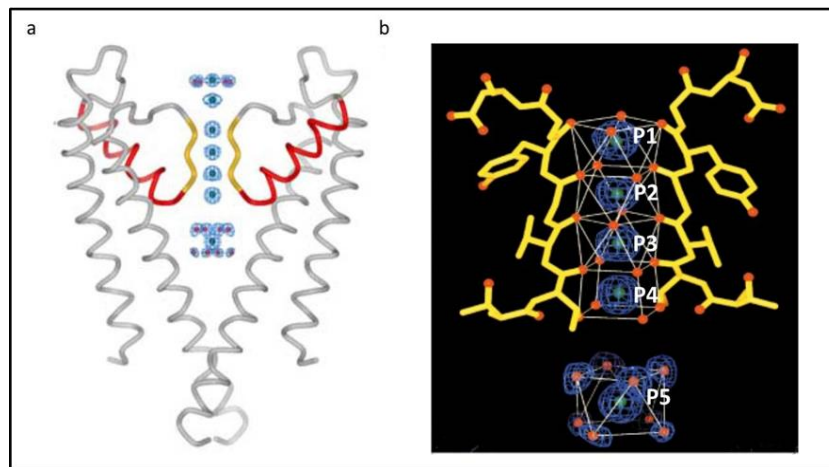
**Figura 3. Organización estructural de los dominios citoplasmáticos de los canales Kv.** A) Organización general de los canales de las familias Kv1-Kv4 con el dominio T1 colgando centralmente del núcleo transmembrana y unido a él a través de cuatro *linkers* que parten de las hélices transmembrana. En esta estructura, probablemente el extremo C-terminal se localiza periféricamente rodeando al T1. B) Estructura general de los canales de las familias Kv7 y Kv10-Kv12 caracterizados porque el dominio C-terminal forma una estructura tetramérica compacta en posición central justamente por debajo del poro citoplasmático. En este caso el extremo N-terminal probablemente rodea el C-terminal. Modificado de Barros et al, 2012. [37]

### 1.2.2 Poro iónico y filtro de selectividad.

El papel fundamental de los canales Kv es el de permitir el paso de iones K<sup>+</sup> a través de la membrana celular. El poro iónico o dominio del poro del canal incluye los segmentos S5 y S6 de cada subunidad, que se colocan de manera simétrica formando la vía de conducción [28, 38, 39]. La vía de conducción propiamente dicha la componen una secuencia de ~20 aminoácidos localizada en el lazo P que une los segmentos S5 y S6 [3, 27]. El estudio cristalográfico del canal KcsA revela que está constituido por dos hélices transmembrana (correspondientes a S5 y S6) unidas por un lazo P que contiene el filtro de selectividad (Figura 4). El lazo P se compone de una hélice descendente y una región ascendente que contiene el motivo GYG, que constituye el filtro de selectividad propiamente dicho [39, 40]. La región del filtro es estrecha y contiene sitios de unión a iones formados por anillos de átomos de oxígeno que se orientan hacia el centro del poro [29, 30]. Estos átomos de oxígeno se corresponden con los de las cadenas de carbonilos del motivo GYG [41]. El poro se caracteriza por presentar en su lado citosólico una amplia cavidad central llena de moléculas de agua que proporciona un ambiente energético favorable para la fijación de los iones de K<sup>+</sup>. Los iones en solución interaccionan fuertemente con la capa



de moléculas de agua. El paso de los iones  $K^+$  a través de la estrecha región del filtro requiere que los iones pierdan su capa de hidratación. De hecho, los átomos de oxígeno del filtro están bien posicionados para actuar como sustitutos de las moléculas de agua y deshidratar los iones  $K^+$  dentro del filtro. Es decir, cuando los iones hidratados entran al filtro, se rodean de ocho átomos de oxígeno de las cadenas de oxígenos laterales y se deshidratan. Los iones  $K^+$  deshidratados tienen un radio de 1.3 Å. Se ha deducido que estos anillos de átomos de oxígeno deben de tener una conformación lo suficientemente rígida como para evitar el paso de iones con un radio menor. De esta forma, los iones  $Na^+$  deshidratados, que tienen un radio de 0.9 Å, no interaccionan favorablemente con las cadenas de oxígenos y, por lo tanto, son rechazados [42-45].



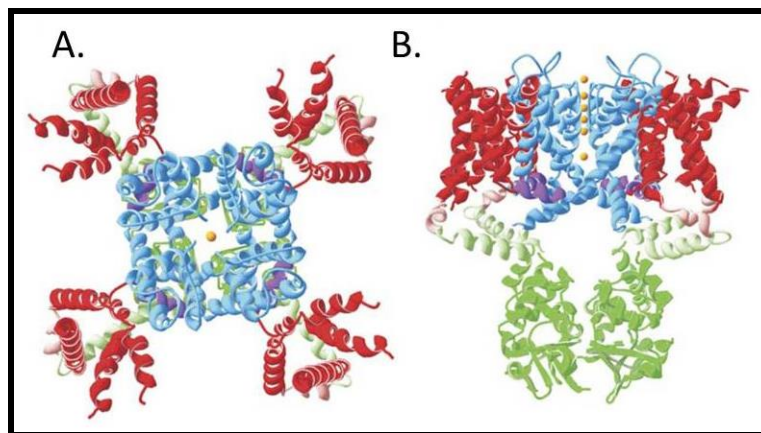
**Figura 4. Poro iónico de los canales de potasio.** a) Se muestran dos de las cuatro subunidades del poro del canal KcsA con los extremos extracelulares en la parte superior. Cada subunidad contiene una hélice exterior hacia la membrana, una hélice interior hacia el poro, una hélice del poro (rojo) y un filtro de selectividad (dorado). Las zonas en azul muestran la densidad de iones  $K^+$  y de moléculas de agua a lo largo del poro. b) Diagrama del filtro de selectividad del canal KcsA. P1-P5 corresponden con los cinco sitios de unión a  $K^+$ . El sitio P0 no se muestra. Cada sitio está formado por ocho átomos de oxígeno (rojo) que rodean a cada ion  $K^+$  (verde) que pasa a través del canal. Los sitios P1-P5 están formados por oxígenos de las proteínas del canal. El sitio P0 está formado por oxígenos de las moléculas de agua. Tomado y modificado de MacKinnon, 2003 y Choe, 2002. [27, 30]

Se han localizado seis sitios de unión a  $K^+$  a lo largo del filtro de selectividad: cuatro internos (P1-P4) y dos externos (P0-P5). Los sitios de unión internos se localizan a medio camino entre dos cuadrados de oxígenos sucesivos, de manera que ocho átomos de oxígeno se pueden coordinar con el ion  $K^+$  posicionándolo en el centro de un antiprisma [30]. El sitio de unión externo P0 se localiza en la entrada externa del filtro y consiste en cuatro oxígenos de las cadenas de carbonilos del filtro y cuatro oxígenos de la capa de agua. El sitio P5 se localiza en la entrada interna del filtro y tiene la misma estructura de antiprisma del resto de sitios, pero en este caso los oxígenos los proporciona únicamente las moléculas de agua (Figura 4). Esto viene a confirmar que es necesaria la sustitución de la capa de hidratación del catión  $K^+$  por átomos de oxígeno para que se pueda producir su paso a través del filtro. Esta estructura sugiere que los canales KcsA y por extensión otros canales de potasio, en realidad son multiporos iónicos

con seis sitios capaces de unir  $K^+$  [38]. En ausencia de  $K^+$  el filtro de selectividad se deforma significativamente, sugiriendo que puede adoptar una conformación no conductora cuando no hay  $K^+$ .

### 1.2.3 Sensor de voltaje de los canales $K_v$ .

Los canales  $K_v$  actúan como sensores eléctricos capaces de detectar pequeños cambios en el potencial de membrana celular y abrirse o cerrarse en respuesta a los mismos. Tradicionalmente se ha considerado que el segmento S4 constituía el sensor de voltaje. Este segmento se caracteriza por tener de 4-8 residuos con carga positiva (argininas o lisinas) separados entre sí por dos residuos hidrofóbicos [46, 47]. Estos residuos cargados del segmento S4 se conocen como dominios sensibles a voltaje (VSDs) (Figura 5) [38, 48]. Posteriormente, se ha comprobado que cargas negativas presentes en los segmentos S1, S2 y S3 son fundamentales para el funcionamiento del sensor, por lo que actualmente, se considera que el sensor de voltaje está constituido por los cuatro segmentos (S1-S4) [49].



**Figura 5. Estructura de los canales de potasio regulados por voltaje.** Clave de colores: VSD: rojo; *linker* S4-S5: violeta; dominio del poro: azul; dominio T1: verde; *linker* T1-S1: verde claro; iones potasio: amarillo. **A)** y **B)** Vista superior (A) y lateral (B) de la estructura cristalográfica de rayos X de  $K_v1.2$ . Tomado de Tombola et al, 2005. [50]

El estudio cristalográfico del canal  $K_v1.2$  ha permitido conocer que los dominios VSD se localizan en las esquinas del dominio del poro y que no contactan con las hélices formadoras del poro de su misma subunidad sino con las de las subunidades vecinas, de manera que este contacto es necesario para que se produzca la apertura del canal [24, 50]. El ensamblaje entre los VSDs y el dominio del poro representa un perfecto acoplamiento electromecánico, en el cual se convierte la energía eléctrica del potencial de membrana en la energía mecánica necesaria para que los dominios VSD produzcan cambios conformacionales que abren el poro y permiten el paso selectivo de iones a su través [34, 51, 52]. Recientemente, mediante trabajos de mutagénesis dirigida, se han encontrado dos fenilalaninas en los VSDs que son fundamentales para mantener la estabilidad del sensor de voltaje cuando el canal está abierto [53, 54]. De esta forma, cuando el ensamblaje electromecánico entre los VSDs y el dominio del poro es correcto, el *gating* del canal está bajo el control de los VSDs, mientras que cuando esta interacción no ocurre o es débil, los VSDs no pueden controlar la apertura y cierre del canal [55].

### 1.3 SUBUNIDADES REGULADORAS DE LOS CANALES $K_v$ .

Las subunidades  $\alpha$  de los canales iónicos regulados por voltaje son las principales responsables de sus características de *gating*, selectividad iónica, conductancia y regulación farmacológica. Sin embargo, *in vivo*, los canales  $K_v$  aparecen como complejos heteromultiméricos ensamblados con subunidades accesorias que modifican su expresión, propiedades funcionales y localización subcelular. Se han descrito múltiples mutaciones en las subunidades reguladoras asociadas con diversas patologías humanas tales como la hipertensión, epilepsia, arritmogénesis, hipotiroidismo y parálisis periódica [56].

**Tabla 1. Efectos de las subunidades reguladora sobre el *gating* de los canales  $K_v$ .** Modificado de Bett et al, 2008. [58]

Subunidad $\alpha$	Familia de subunidad reguladora	Parámetro del <i>gating</i> modificado por la subunidad
$K_v1.1$	$K_v\beta$	Introduce inactivación
$K_v1.2$	$K_v\beta$	Introduce inactivación
$K_v1.4$	$K_v\beta$	Incrementa el grado de inactivación Enlentece la recuperación de la inactivación
$K_v1.4\Delta N K_v\beta$	$K_v\beta$	Incrementa el grado de inactivación
$K_v1.5$	$K_v\beta$	Introduce inactivación Cambia la cinética de activación Enlentece la deactivación
$K_v2$	KCNE3	Enlentece la activación y deactivación
$K_v3$	KCNE3	Enlentece la activación y deactivación Cambia la cinética de activación Incrementa el grado de recuperación de la inactivación
$K_v4$	KCHIPs	Altera el grado de inactivación Acelera la recuperación de la inactivación
	KCNE1	Enlentece la activación e inactivación Enlentece la recuperación de la inactivación
	KCNE2	Enlentece la activación Cambia la cinética de activación e inactivación Enlentece la inactivación
	KCNE3	Enlentece y cambia la activación e inactivación Enlentece la recuperación de la inactivación
	$K_v\beta$	Cambia la cinética de inactivación Enlentece la recuperación de la inactivación
$K_v7.1$	KCNE1	Enlentece la activación Abole la inactivación
	KCNE2	Introduce activación instantánea Incrementa el grado de deactivación
	KCNE3	Canal constitutivamente abierto
	KCNE4	Enlentece y cambia la activación
	KCNE5	Enlentece y cambia la activación Acelera la deactivación
$K_v11.1$	KCNE1	Acelera la activación
	KCNE2	Enlentece y cambia la activación Acelera la deactivación

Algunas subunidades accesorias, como por ejemplo las subunidades  $\beta$  de los canales de la familia  $K_v7$ , son proteínas integrales de membrana con secuencias amino y carboxi-terminal adicionales que se extienden hacia el espacio extra o intercelular. Otras subunidades son proteínas citosólicas que se unen a los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $K_v$ , como por ejemplo las subunidades reguladoras KCHIP de los canales de la familia  $K_v4$  o las subunidades reguladoras  $K_v\beta$ . Hasta la fecha, no se han descrito subunidades reguladoras extracelulares [57]. Existe una gran variedad

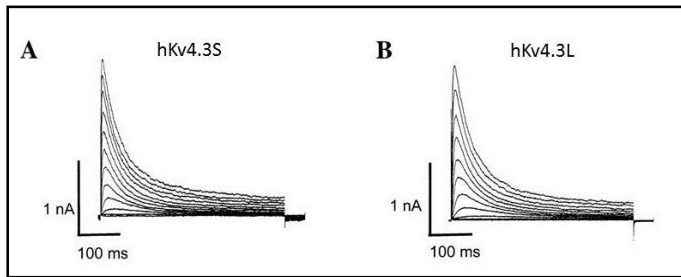
de subunidades accesorias para los canales  $K_V$ , cada una de ellas con unas características y patrones de expresión específicos. Además, afectan a las propiedades cinéticas de los canales con los que se asocian de manera distinta. Así, por ejemplo, existen miembros de la familia de subunidades  $\beta$  que confieren una inactivación rápida a los canales  $K_V$  a los que se unen, mientras que otros miembros ni siquiera inactivan la corriente del canal (Tabla 1) [58, 59].

### 1.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES $K_V4.3$ .

Los canales  $K_V4.3$  pertenecen a la subfamilia conocida como *Shal* de los canales de potasio regulados por voltaje y presentan altos niveles de expresión en cerebro, corazón y músculo liso [60, 61]. La subfamilia *Shal* ( $K_V4x$ ) es responsable de la corriente somato-dendrítica de tipo A ( $I_A$  o  $I_{SA}$ ) en neuronas y de la corriente transitoria de salida ( $I_{to}$ ) en miocitos cardiacos [62].

La familia *Shal* en mamíferos está formada por tres genes distintos:  $K_V4.1$ ,  $K_V4.2$  y  $K_V4.3$  [62]. Estos genes codifican proteínas con una alta homología estructural en sus regiones transmembrana (~65-70%) y diferencias en sus extremos amino y carboxi-terminal. Estos canales presentan muchos de los elementos estructurales que están presentes en el resto de los canales de  $K^+$ , incluyendo el dominio amino terminal intracelular, el dominio T1, los seis segmentos transmembrana (S1-S6), el sensor de voltaje (S1-S4), el dominio del poro (S5-S6) y el extremo carboxi-terminal citoplasmático. Las subunidades  $\alpha$  de los canales  $K_V4$  forman tetrámeros con miembros de su propia subfamilia a través del dominio T1 [63]. El dominio T1 de los canales  $K_V4$  presenta cuatro sitios de unión a  $Zn^{2+}$ , localizados en la interfase entre dos monómeros adyacentes, que están implicados en el contacto entre subunidades. El sitio de unión entre subunidades  $\alpha$  está compuesto por tres cisteínas y una histidina siguiendo una secuencia característica en la que la Cys 131, Cys 132 e His 104 vienen de un monómero, mientras que la Cys 110 viene del otro monómero. Este motivo de unión a  $Zn^{2+}$  sólo está presente en los canales de las familias *Shab*, *Shal* y *Shaw*, sugiriendo que el ensamblaje de los canales de la familia *Shaker* es diferente. Además, el dominio T1 de los canales  $K_V4$  tiene un lazo (~70-90 aminoácidos) que se extiende desde la superficie de la molécula y media la interacción con subunidades accesorias [64-66].

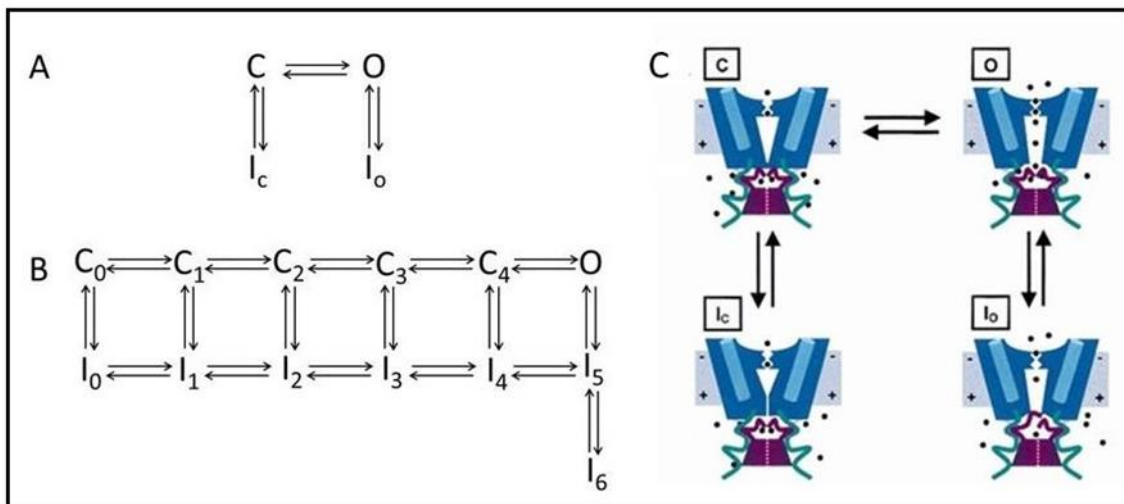
En humanos, los canales  $K_V4.3$  presentan dos variantes obtenidas por *splicing* alternativo: una variante más larga (h $K_V4.3-L$ ), que contiene 19 aminoácidos insertados en su extremo carboxi-terminal con un sitio consenso de fosforilación para PKC; y una variante corta (h $K_V4.3-S$ ), que carece de esta región [67, 68]. La subunidad codificada por h $K_V4.3-L$  es necesaria para proporcionar al canal sensibilidad a la regulación  $\alpha_1$ -adrenérgica [69]. El gen que codifica los canales  $K_V4.3$  en humanos se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 e incluye, al menos, 40kb del genoma. Ambas variantes están presentes en el miocardio auricular y ventricular humano. Por otro lado, se ha demostrado que mientras que los niveles de proteína de  $K_V4.3$  son mayores en el epicardio que en el endocardio humano, los niveles de mRNA se mantienen uniformes [70-74].



**Figura 6. Características electrofisiológicas de las variantes de *splicing* de los canales hKv4.3.** Corriente representativa producida por pulsos despolarizantes en células *Ltk* transfectadas con hKv4.3S (A) y hKv4.3L (B). El potencial de *holding* fue de -80mV y los pulsos despolarizantes se hicieron en incrementos de 10mV. Tomado de Kong et al, 1998. [67]

En cuanto a sus propiedades cinéticas, los canales  $K_v4.3$  se caracterizan porque se activan a potenciales de membrana por debajo del umbral, presentan una activación rápida y sigmoidal, inactivan rápidamente y de un modo multiexponencial, y recuperan la inactivación rápido (Figura 6) [75, 76]. La curva de activación de estos canales parece ser más compleja que la observada en el resto de canales  $K_v$ . La pendiente de la curva de activación en el estado estacionario es, de media, dos o tres veces mayor que la observada en otros canales. Esto puede explicarse por las diferencias que existen en las secuencias de aminoácidos del segmento S4 entre los canales  $K_v4$  y el resto de canales  $K_v$ . Así,  $K_v4.3$  tiene sólo cinco cargas positivas mientras que el resto de canales presenta siete. Además los canales  $K_v4.3$  tienen siete residuos no cargados en el segmento S4 distintos a los del resto de canales  $K_v$  [77, 78]. Sin embargo, lo más característico de los canales  $K_v4.3$  es su mecanismo de inactivación. En los canales  $K_v$  la inactivación está regulada por dos mecanismos principales: una inactivación más rápida, de tipo N, basada en un mecanismo de bola y cadena que obstruye el vestíbulo interno del canal; y una inactivación de tipo C, que es más lenta, y ocluye el poro externo e interno [75, 79, 80]. En los canales  $K_v4.3$  la inactivación es un mecanismo mucho más complejo, multiexponencial, y distinto a la inactivación de tipo N y C. Se considera que en los canales  $K_v4$ , estos dos procesos inactivantes permanecen de forma vestigial. La primera fase rápida de la inactivación implicaría a los dominios citoplasmáticos amino y carboxi-terminal y la fase de inactivación final más lenta estaría mediada por el vestíbulo interno del poro [78, 79, 81]. Otra diferencia importante es, que mientras que los canales  $K_v$  inactivan únicamente desde el estado abierto, los canales de la familia  $K_v4$  inactivan preferentemente desde el estado cerrado [78, 79, 82]. Además, a diferencia del resto de canales  $K_v$ , la inactivación de los canales  $K_v4$  no se ve afectada por altas concentraciones de TEA, y los niveles elevados de iones  $K^+$  en el exterior, aceleran el proceso de inactivación y no afectan a la recuperación de la inactivación [83, 84]. Debido a todo esto, la inactivación de los canales  $K_v4$  ha sido objeto de múltiples investigaciones y se han postulado numerosas hipótesis sobre su cinética de inactivación. Los modelos más sencillos apuntan a dos posibles vías de inactivación, y consideran que para que la inactivación sea completa los canales  $K_v4$  deben estar previamente cerrados (Figura 7A) [77, 83, 85]. Estos modelos se basan en que tras entrar los canales  $K_v4$  en un estado abierto (O), pueden pasar transitoriamente a un estado abierto inactivo ( $I_o$ ) no conductor; pero, en última instancia, se acumulan en un estado cerrado inactivo ( $I_c$ ). Desde el estado  $I_c$  los canales recuperan directamente (C). De este modo, la recuperación se considera un proceso “eléctricamente

silencioso” debido a que no hay corrientes de reapertura. Este modelo, también se conoce como modelo alostérico, y asume dos premisas: I) que la inactivación desde el estado abierto está mediada por el extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  del canal y cinéticamente se corresponde con la constante de tiempo rápida ( $\tau_{fast}$ ) de la inactivación; y II) que la inactivación desde el estado cerrado está mediada por cambios conformacionales cerca de la cara interna del poro y cinéticamente se corresponde con la constante de tiempo lenta ( $\tau_{slow}$ ) de la inactivación (Figura 7C) [74, 76, 78, 83, 85]. Este modelo también asume que las transiciones entre los diferentes estados no son dependientes de voltaje. El modelo es la base para entender el proceso de inactivación de los canales  $K_v4$  y explica qué ocurre con las cinéticas de inactivación durante el proceso de despolarización sin embargo, no demuestra qué ocurre a potenciales hiperpolarizantes.



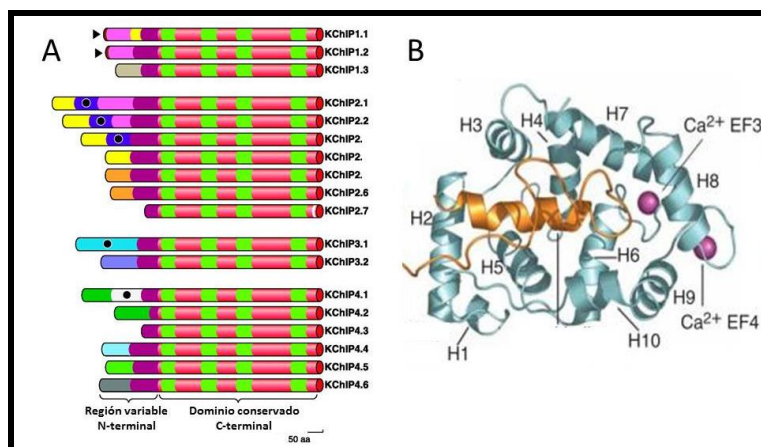
**Figura 7. Modelo esquemático del gating de los canales  $K_v4$ .** **A)** Esquema simplificado que muestra las dos posibles vías de inactivación de  $K_v4$ . **B)** Esquema de inactivación compleja basada en los estudios de Jeng et al, 1999; Beck y Covarrubias, 2001 y Bähring et al, 2001. **C)** Diagrama conceptual del gating de inactivación de los canales  $K_v4$ . Sólo se representan dos subunidades del tetrámero. El dominio de tetramerización T1 se representa como un bloque morado en la base del canal. En el estado cerrado (C), el canal se activa pero aún permanece cerrado. Las cargas positivas en el sensor de voltaje (cilindros azules) se han movido hacia el exterior (la membrana se despolariza). Este estado cerrado precede a la apertura del poro y se permite la inactivación. Cuando el canal se abre (O) se produce la apertura de una puerta interna. Los iones (puntos negros) ingresan en el canal a través de ventanas laterales y cruzan la membrana a través del poro selectivo. También se representan los dos estados inactivados: lo (desde el estado abierto) e lc (desde el estado cerrado preabierto). La región proximal de los dominios citoplásmicos C-terminal del tetrámero (cintas verdes) mantiene los dominios N-terminales en su lugar (cintas de color morado atadas al dominio T1). El N-terminal ocluye fácilmente la boca interior de la vía de conducción cuando se abre el canal. Modificado de Beck et al, 2002. [78]

Con el tiempo se han ido considerando modelos mucho más complejos que implican más estados transitorios. En el modelo más aceptado propuesto por Beck y colaboradores [78], el estado abierto se representa como un agregado de estados abiertos, ya que los análisis electrofisiológicos de canal único han revelado, al menos, tres niveles conductores en los canales  $K_v4$ . Las transiciones de apertura son poco dependientes de voltaje mientras que las transiciones entre los distintos estados cerrados son muy dependientes de voltaje. Las transiciones que implican inactivación siguen siendo independientes de voltaje. Se ha observado que los canales  $K_v4.3$  muestran una inactivación significativa

desde el estado abierto a voltajes positivos ( $O \leftrightarrow I_5 \leftrightarrow I_6$ ). Sin embargo, la inactivación desde el estado cerrado  $C_4$  es la vía preferente de inactivación tras un pulso prolongado despolarizante, porque se asume que los estados  $I_5$  e  $I_6$  son algo inestables mientras que el canal cerrado es estable a cualquier voltaje ( $O \leftrightarrow C_4 \leftrightarrow I_4$ ). Así, a voltajes positivos, el estado  $I_4$  es el estado mayoritario en el estado estacionario y desde donde el canal se recupera tras la repolarización (Figura 7B). El mecanismo molecular de inactivación del canal implica que el extremo carboxi-terminal del tetrámero fija el amino terminal cerca de la cara interna del poro, desde donde puede ocluir el poro tras la apertura del canal. Por tanto, el canal se abre y se cierra para someterse a una inactivación desde un estado cerrado pre-abierto, lo que implica cambios conformacionales en el vestíbulo interno del poro (Figura 7C). A este mecanismo de inactivación se le ha dado el nombre de inactivación de tipo V [77, 81, 86]. Cabe destacar que los canales  $K_v4.3$  pueden unirse a múltiples subunidades reguladoras que alteran las propiedades cinéticas del canal, haciendo que el proceso de inactivación resulte mucho más complejo.

### 1.5 PROTEÍNAS DE INTERACCIÓN CON CANALES $K_v$ : KChIPs.

La gran variedad de propiedades cinéticas de los canales  $K_v4$  se debe a su interacción con diferentes subunidades auxiliares. De ellas, las más importantes son las KChIPs y las DPPLs ya que en su ausencia, los canales  $K_v4$  no son capaces de reconstruir las características de las corrientes  $I_A$  e  $I_{to}$  *in vivo*. Estos dos tipos de subunidades auxiliares pueden unirse juntas o por separado a los canales  $K_v4$  y regular su tráfico, localización en la membrana, endocitosis, así como sus propiedades cinéticas [87].



**Figura 8. A) Diagrama de barras de la familia de proteínas KChIP.** El *splicing* alternativo de los cuatro genes humanos genera una gran variedad de isoformas con extremos N-terminales variables y C-terminales conservados. (Tomado de Pongs et al, 2010) [57]. **B) Diagrama de cintas de una molécula de KChIP.** Se muestra el linker T1 en naranja, las hélices (H1-H10) en cian y los iones  $Ca^{2+}$  en morado. Tomado de Pioletti et al, 2006. [92].

La familia de proteínas de interacción con canales  $K_v$  o KChIPs consta de cuatro genes (KChIP1-4) que dan lugar a múltiples isoformas mediante *splicing* alternativo (Figura 8A) [57]. Esto hace de las KChIPs la familia de subunidades reguladoras de canales más diversa. Cabe destacar, que mientras que KChIP1-4 se expresan mayoritariamente en tejido neuronal, KChIP2 es la única forma localizada en tejido cardíaco [88]. Todas las isoformas se caracterizan porque contienen una región carboxi-terminal altamente conservada con aproximadamente 180 aminoácidos, y un extremo amino-terminal variable en secuencia y longitud. Las KChIPs son proteínas de unión a calcio y se incluyen dentro de la superfamilia de las *Neuronal Calcium Sensor* (NCS). Por tanto, contienen cuatro motivos mano-EF de unión a  $Ca^{2+}$  en

su extremo carboxi-terminal con  $\text{Ca}^{2+}$  unido en el tercer y cuarto dominio EF. Los estudios cristalográficos muestran que los dominios EF1 y EF2 forman el lóbulo N, mientras que EF3 y EF4 forman el lóbulo C. Cada lóbulo consiste en cinco hélices  $\alpha$ . Además de las ocho hélices  $\alpha$  implicadas en formar los cuatro dominios EF (H2-H9), estas proteínas tienen una hélice  $\alpha$  hidrofílica amino terminal (H1) y otra hidrofóbica carboxi terminal (H10) (Figura 8B) [88, 89].

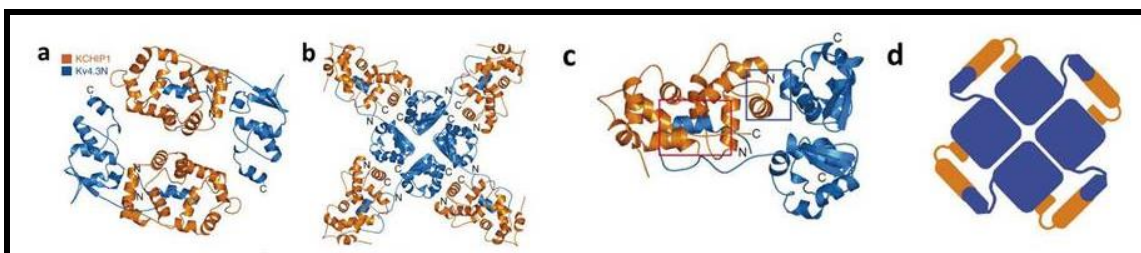
Se ha demostrado que mutaciones puntuales en los dominios EF atenúan la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a las KChIPs, de manera que el mutante es capaz de unirse a  $\text{K}_v4$  pero pierde la capacidad de modular la inactivación de estos canales. Estos resultados sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  puede afectar a la cinética de los canales  $\text{K}_v4$  a través de sus subunidades reguladoras [64, 90]. Por otro lado, existe un dominio supresor de la inactivación (KIS) en el extremo amino terminal que únicamente se ha descrito en la isoforma KChIP4a. Este dominio forma una hélice  $\alpha$  extendida que ocasiona cambios conformacionales en el núcleo central de la KChIP y evita que se produzca el aumento de expresión del canal característico de la presencia de las KChIPs, ya que favorece la retención del canal en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi [66, 91].

Los estudios cristalográficos de los complejos KChIP1- $\text{K}_v4.3$  han revelado un modelo de unión en el cual una única molécula de KChIP1 se une lateralmente a los extremos amino terminal de dos moléculas de  $\text{K}_v4.3$  vecinas, siguiendo una estequiometría de 4:4; con dos interfaces de contacto implicadas en dicha interacción. En la primera interfase, el extremo amino-terminal hidrofóbico (residuos 6-21) de  $\text{K}_v4.3$  se dispone hacia afuera alcanzando un surco profundo de la superficie de KChIP1, formado por el desplazamiento de la hélice H10. La hélice H10 es reemplazada por el extremo amino terminal de  $\text{K}_v4.3$ , de manera que se mueve hacia afuera  $40^\circ$  dejando libre el surco hidrofóbico que en las moléculas de KChIP1 aisladas, está totalmente oculto. Al mismo tiempo, las hélices H2 y H8 se mueven también hacia afuera contribuyendo a la exposición del surco en la superficie de KChIP1. Este contacto ocasiona la supresión física de la inactivación de  $\text{K}_v4.3$  por las KChIPs. La segunda interfase involucra a la hélice H2 de la misma molécula de KChIP1 que interacciona con el dominio T1 de la subunidad  $\alpha$  de la molécula  $\text{K}_v4.3$  vecina (Figura 9). Este contacto es fundamental para la estabilización del complejo. Este mecanismo de unión en el cual una misma molécula KChIP interacciona simultáneamente con dos subunidades  $\alpha$  de  $\text{K}_v4.3$  se repite cuatro veces provocando la estabilización del tetrámero de los canales  $\text{K}_v4.3$  [62, 92-97]. Desafortunadamente, estos estudios no han revelado el papel del extremo carboxi-terminal en la unión entre subunidades. Sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que este extremo está implicado en la expresión en superficie así como en las propiedades de *gating* de los canales  $\text{K}_v4.3$ .

Una de las características más importantes de las KChIPs es que afectan al *gating* de los canales de la familia  $\text{K}_v4$ . De esta forma alteran la dependencia de voltaje y de tiempo de las corrientes  $\text{K}_v4$  y por lo tanto, son importantes reguladores de la actividad de estos canales en las células excitables. Así, mientras que KChIP1-3 incrementan la amplitud de la corriente, hacen más lenta la inactivación y



aceleran la recuperación de la inactivación; KChIP4 disminuye la magnitud de la corriente y elimina la inactivación rápida característica de los canales de la familia  $K_v4$  [57, 88]. La aceleración de la recuperación de la inactivación implica que las KChIPs afectan a las transiciones entre los estados inactivos del canal. Esto sugiere, que cuando estas subunidades reguladoras están presentes, el estado inactivo es menos estable. Cuando se mide la recuperación de la inactivación en presencia del fármaco nifedipina se observa que la recuperación de los canales  $K_v4.3$  se hace más lenta. Sin embargo, cuando están las KChIPs presentes, el fármaco no tiene efecto sobre la recuperación de la inactivación. Esto sugiere que las KChIPs alteran la capacidad de los canales  $K_v4$  para unirse a fármacos [58]. Por otro lado, se ha demostrado que algunas KChIPs tienen sitios de palmitoilación que son importantes para controlar la expresión en superficie de canales  $K_v4$  funcionales [63].

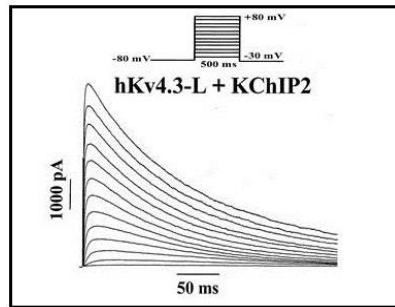


**Figura 9. Estructura de los complejos  $K_v4.3N$ -KChIP1.** a) Representación esquemática de la estructura del complejo en una unidad asimétrica. Las dos moléculas de KChIP1 y las dos de  $K_v4.3$  se muestran en naranja y azul, respectivamente. b) Estructura 4:4 del complejo  $K_v4.3N$ -KChIP1. c) Una molécula de KChIP1 interacciona simultáneamente con dos moléculas de  $K_v4.3$ . En el complejo, cada KChIP1 no solo se une al péptido N-terminal de una molécula de  $K_v4.3$  sino que también interacciona con el dominio T1 de otro  $K_v4.3$  adyacente, formando dos interfaz de contacto; la primera interfaz se muestra en el recuadro rojo y la segunda en el recuadro azul. d) Dibujo del complejo KChIP1 –  $K_v4.3N$  en 4:4 que muestra el efecto de sujeción de la molécula de KChIP1 en el tetrámero de  $K_v4.3$ . Tomado de Wang et al, 2007. [62]

Otro papel importante de las KChIPs es que promueven la liberación de los complejos de canales  $K_v4$  del retículo endoplásmico y/o su retención en el aparato de Golgi. En este sentido, varios estudios sugieren que el extremo amino terminal de las subunidades  $\alpha$  de  $K_v4$  podría actuar como una señal de retención, que sería enmascarada o desactivada por una interacción eficiente con las KChIPs [91, 98].

#### 1.5.1 Características de KChIP2.

KChIP2 se caracteriza por ser la única KChIP que se ha localizado en tejido cardíaco. Al igual que  $K_v4.3$ , esta proteína se expresa tanto en aurícula como en ventrículo. Su principal función fisiológica es formar junto a los canales  $K_v4.3$  la corriente transitoria de salida ( $I_{to}$ ) en miocitos cardíacos. Debido a esto, KChIP2 está implicada en la génesis y progresión de enfermedades cardíacas humanas tales como arritmias y fallo cardíaco [99-102]. En ventrículo canino y humano, la densidad de mRNA y proteína de KChIP2 aumenta desde el endocardio al epicardio, mientras que los niveles de mRNA de  $K_v4.3$  se mantienen uniformes. Debido a esto, se asume que el gradiente de KChIP2 regula el gradiente proteico de  $K_v4.3$  y a su vez el gradiente de la corriente  $I_{to}$  [57].



**Figura 10. Características electrofisiológicas de los canales hKv4.3L-KChIP2.** Las corrientes fueron obtenidas de células HEK293 transfectadas. Modificado de Deschenés et al, 2011. [109]

Existen diferentes variantes de KChIP2 obtenidas por *splicing* alternativo del gen hKCNIP2. Este gen se localiza en el cromosoma 10, en una región en la que se han mapeado dos enfermedades humanas conocidas como fibrilación auricular hereditaria y epilepsia parcial con fallo auditivo. Esto implica que una mala función de la proteína KChIP2 podría afectar al desarrollo de estas patologías [103]. Todas las isoformas de KChIP2 incrementan la magnitud de la corriente y modifican la dependencia de voltaje y el *gating* de los canales  $K_{v4.3}$  (Figura 10) [104]. Sin embargo, los efectos varían en función de la isoforma KChIP2 que se ensamble con dichos canales. En un principio se clonaron dos isoformas de KChIP2 en corazón humano, una isoforma de 252 aminoácidos (KChIP2b o KChIP2L) que se forma por la pérdida del exón3; y una isoforma de 220 aminoácidos (KChIP2c o KChIP2S) que se origina por la pérdida de los exones 2 y 3 [105]. La isoforma completa se conoce como KChIP2a y presenta niveles de expresión mínimos en corazón humano [106, 107]. KChIP2c es la variante mayoritaria en corazón humano y sus efectos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación son más pronunciados que los producidos por KChIP2b [102]. Las tres isoformas retrasan la cinética de inactivación de la corriente de  $K_{v4.3}$ ; sin embargo, mientras que KChIP2a y KChIP2c aceleran la recuperación de la inactivación, KChIP2b no tiene efectos sobre este proceso [108-110]. Estas tres variantes se caracterizan porque difieren en su región amino-terminal, concretamente en la región que precede al primer dominio EF, ejerciendo distintos efectos sobre la corriente en presencia o ausencia de  $Ca^{2+}$ . Así, se ha demostrado que el aumento en la densidad de la corriente y la aceleración de la recuperación de la inactivación no requieren la unión de  $Ca^{2+}$  a las KChIPs. [109].

Posteriormente se han descrito nuevas isoformas de las que aún se conocen pocos datos. Patel y colaboradores [111] describieron la variante KChIP2d en hurón. Esta proteína se caracteriza por tener sólo un dominio EF y ser la forma más corta, ya que sólo contiene los últimos 70 aminoácidos del extremo carboxi-terminal [111-113]. Además, en humanos, se han localizado las isoformas KChIP2e, KChIP2f, KChIP2g y KChIP2t. KChIP2e y KChIP2f se caracterizan por tener secuencias carboxi-terminales distintas a las de la isoforma completa con un exón 10 alternativo, y aunque están presentes en el corazón humano se desconoce su función *in vivo*. KChIP2e se caracteriza porque tiene efectos contrarios a los del resto, de manera que reduce la magnitud de la corriente y hace más lenta la recuperación de la inactivación. KChIP2g presenta variaciones en la región amino-terminal ya que tiene un exón 1 distinto, lo que ocasiona que desplace la curva de inactivación hacia potenciales negativos. En cuanto a KChIP2t,

tiene la misma secuencia que KChIP2c salvo por siete aminoácidos insertados entre los exones 4 y 5 [105].

### 1.5.2 Características de KChIP3.

KChIP3, también conocido como DREAM o calsenilina, es una proteína multifuncional de unión a  $Ca^{2+}$  que ejerce distintas funciones según su localización subcelular. KChIP3 se expresa principalmente en el sistema nervioso central aunque también en tiroides, sistema inmune, corazón y gónadas en humanos [57, 114]. Está codificado por el gen hKCNIP3 que origina una única isoforma. La pérdida de expresión de KChIP3 en ratones KO provoca una disminución significativa de la corriente  $I_A$  en neuronas [115, 116].

En el núcleo celular KChIP3 (identificado al principio como DREAM) actúa como un represor de la transcripción génica, capaz de formar tetrámeros y unirse a los sitios DRE (*downstream regulatory element*) del DNA, reprimiendo la expresión de los genes diana en ausencia de  $Ca^{2+}$ . En presencia de  $Ca^{2+}$ , se producen cambios conformacionales en la molécula que hacen que se libere del DNA y permita que aumente la expresión de los genes sobre los que actúa. En principio se consideró que la secuencia DRE era un elemento inductor de la expresión del gen de la prodinorfina, que codifica para una proteína implicada en la nocicepción así como en el aprendizaje y la memoria. Posteriormente se ha comprobado que existen muchos más genes que tienen secuencias DRE y que por tanto también están regulados por KChIP3. Entre estos genes se incluyen factores de transcripción tales como c-fos, c-jun e ICER. Así mismo, KChIP3 también es capaz de regular la expresión de otros genes que carecen de secuencias DRE mediante la interacción con otras nucleoproteínas como por ejemplo CREB o TTF-1 [117-123]. Todo esto hace que KChIP3 esté implicado en múltiples funciones fisiológicas. Así, por ejemplo, está implicado en la respuesta al dolor [124-126], en el desarrollo de la memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica debido a sus altos niveles de expresión en hipocampo [127-129] y también regula la expresión de citoquinas en los linfocitos T [130, 131]. KChIP3 regula además la supervivencia neuronal en respuesta a estrés oxidativo [132]. Se ha observado una disminución en los niveles de expresión de KChIP3 en el hipocampo de pacientes con epilepsia crónica, poniendo de manifiesto su implicación en esta patología [60].

En el citosol, KChIP3 (identificado en este caso como calsenilina) se une a la región carboxi-terminal de presenilinas e induce la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico. De esta manera regula la actividad secretasa de las presenilinas y la agregación de placas amiloides en las neuronas. Parece ser que esta interacción es independiente de la unión de KChIP3 a  $Ca^{2+}$ . Puesto que la enfermedad de Alzheimer está frecuentemente asociada a mutaciones en estas proteínas puede considerarse que KChIP3 está implicado en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, su papel aún no está claro [124, 133-139].

Fuera del núcleo, KChIP3 puede interactuar con el extremo amino-terminal de los canales de la familia  $K_v4$ . Esta unión ocurre en el retículo y tras la misma, KChIP3 facilita el tráfico del canal a la

membrana celular. De esta manera, KChIP3 regula la magnitud de la corriente y también el *gating* de los canales  $K_v4$ , ralentizando la inactivación y acelerando la recuperación del estado funcional. Aunque la unión entre el canal y la subunidad reguladora es independiente de  $Ca^{2+}$ , la regulación del *gating* requiere que los dominios EF de KChIP3 permanezcan íntegros. Mutaciones en los dominios EF ocasionan la pérdida de su capacidad para inducir la rápida recuperación de la inactivación [90, 140, 141].

Se ha comprobado que los cuatro dominios EF tienen capacidad de unir  $Ca^{2+}$ , aunque la mayor afinidad se localiza en los dominios EF3 y EF4. La unión de  $Ca^{2+}$  produce cambios estructurales en la molécula de KChIP3 que dificultan su interacción con las proteínas del canal. También se han localizado en la secuencia de KChIP3 sitios de unión a  $Mg^{2+}$  que tienen mucha menos afinidad que para el  $Ca^{2+}$  y que no afectan a la estructura de la proteína [140-142].

KChIP3 está regulada por quinasas (GRK6 y GRK2) que lo fosforilan en la serina 95. Esta fosforilación no afecta a su capacidad represora, sin embargo tiene una gran influencia en el transporte de los canales  $K_v4$  hacia la membrana celular. Este proceso es altamente dependiente de  $Ca^{2+}$ . Además, se han localizado al menos dos sitios de sumoilación (K26 y K90), que son necesarios para la localización nuclear de KChIP3, ya que mutaciones en cualquiera de ellos inhiben la translocación nuclear de la proteína. Para un correcto transporte de los canales  $K_v4$  a la membrana es necesario que KChIP3 sufra palmitoilaciones en las cisteínas 45 y 46. Mutaciones en estos residuos hacen que no se produzca el característico incremento en la magnitud de la corriente producido tras el ensamblaje del canal  $K_v4.3$  a KChIP3 [143, 144]. El estado redox de estas dos cisteínas también regula la actividad transcripcional de KChIP3 [124].

### 1.6 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA CORRIENTE CARDÍACA TRANSITORIA DE SALIDA DE POTASIO ( $I_{to}$ ).

En mamíferos, la corriente  $I_{to}$  tiene dos componentes, un componente rápido ( $I_{to,f}$  o  $I_{to1}$ ) que se caracteriza por una rápida activación, inactivación y recuperación de la inactivación, está generado por la salida de  $K^+$  y es sensible al bloqueo por 4-aminopiridina (4-AP) [145, 146]. La  $I_{to,f}$  está mediada por los canales  $K_v4.2$  y  $K_v4.3$ . El segundo componente es más lento ( $I_{to,s}$ ), se activa en respuesta al aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , está mediado por  $Cl^-$  y no es sensible al bloqueo por 4-AP. Este componente se produce por la actividad de los canales  $K_v1.4$  [57].

La corriente  $I_{to}$  en mamíferos es responsable de la primera fase de repolarización del potencial de acción (fase 1) y al mismo tiempo controla la prolongación de la fase de meseta y por tanto, la duración del potencial de acción [147]. La inhibición de la  $I_{to}$  lleva a una despolarización en la fase de meseta mientras que un aumento en la corriente produce la hiperpolarización de dicha fase [148-150].

La  $I_{to,f}$  está regionalmente distribuida a través del ventrículo en perro, gato, conejo y humanos; siendo la densidad de la corriente mayor en el epicardio que en el endocardio. Puesto que los niveles de mRNA de  $K_v4.3$  se mantienen constantes a lo largo de la pared del ventrículo, se considera que es el gradiente de expresión de KChIP2 el que determina el patrón de expresión de la corriente  $I_{to,f}$  [151]. En ventrículos

de humanos sanos, la densidad de la corriente es ~50% mayor en las células epicárdicas que en las endocárdicas [152-155].

Se ha observado que la  $I_{to,f}$  está regulada por señalización  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgica. La estimulación  $\alpha$ -adrenérgica provoca la inhibición de la corriente, mientras que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, al menos en parte, contrarresta los efectos de la  $\alpha$ . Los efectos adrenérgicos sobre la corriente  $I_{to,f}$  se deben a la fosforilación de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $K_v4.3$  por PKA, PKC y PKG [69, 156-162]. La CaMKII regula el grado de inactivación de la corriente  $I_{to}$  en los miocitos humanos mediante la fosforilación de  $K_v4.3$  [163-166]. Por otro lado, se ha observado que la  $I_{to}$  está regulada por hormonas sexuales en el miometrio, de manera que una disminución en los niveles de  $K_v4.3$  puede prolongar la duración del potencial de acción, lo que se traduce en contracciones más enérgicas al final del parto [167]. El receptor AT1 también está directamente implicado en la regulación de la  $I_{to}$  ya que se ha observado en miocitos de rata y perro que la estimulación a través de AT1 produce una inhibición de la corriente [168, 169].

Debido a su papel regulando el inicio y la duración del potencial de acción, la  $I_{to}$  está implicada en múltiples patologías cardíacas. Durante la isquemia miocárdica se produce un acortamiento del potencial de acción que podría explicarse por una reducción en la densidad de la corriente  $I_{to,f}$  ocasionada mediante señalización  $\alpha$ -adrenérgica [170, 171]. En la hipertrofia se incrementa la  $I_{to,f}$  aumentando la duración del potencial de acción [172-175]. Por el contrario, los estados agudos de fallo cardíaco se caracterizan por una reducción de la  $I_{to,f}$  en las células endocárdicas [156, 176-179].

Los cardiomiocitos aislados de corazones diabéticos muestran niveles reducidos de  $I_{to,f}$  que se correlacionan con bajos niveles de  $K_v4.2$  y  $K_v4.3$  [180-182]. Los modelos de infarto de miocardio revelan una disminución de la  $I_{to}$  principalmente en el epicardio, que también se relacionan con bajos niveles de mRNA de  $K_v4.2$  y  $K_v4.3$  [60, 183]. En el caso de la fibrilación auricular también se reducen los niveles de proteína  $K_v4.3$  y por tanto la densidad de la  $I_{to}$  [184, 185]. Mutaciones en las subunidades  $\alpha$  de  $K_v4.3$  incrementan la  $I_{to}$  y están asociados con el síndrome de Brugada [186, 187]. En otras arritmias cardíacas se ha encontrado que variaciones en los niveles de las subunidades reguladoras pueden ser suficientes para causar una disminución en la corriente  $I_{to}$ . Todo esto hace que la regulación de la corriente  $I_{to}$  represente una potente diana farmacológica para el tratamiento de patologías cardíacas.

### 1.7 PAPEL FISOLÓGICO DE LA CORRIENTE NEURONAL DE TIPO A ( $I_A$ o $I_{SA}$ ).

La corriente neuronal de  $K^+$  de tipo A ( $I_A$  o  $I_{SA}$ ) en el sistema nervioso se caracteriza por tener una inactivación y recuperación de la inactivación rápidas y por activarse a potenciales de membrana por debajo del umbral. Regula el perfil del potencial de acción, la latencia del mismo durante la despolarización, controla la retro-propagación de los potenciales y regula la frecuencia de disparo [188, 189]. Por tanto, la  $I_A$  regula la excitabilidad neuronal. Esta corriente es muy sensible al bloqueo por 4-AP y poco sensible a TEA [190, 191]. Las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas que muestra la corriente  $I_A$  así como su patrón de expresión, han llevado a determinar que la familia de canales  $K_v4$  es la principal responsable de la generación de esta corriente [87, 191-193]. Puesto que las subunidades  $\alpha$  de

los canales  $K_v4$  solas no son capaces de reconstruir las características de la  $I_A$ , se considera que deben formar complejos con subunidades accesorias para formar la corriente en las células nativas [194-196]. Entre estas subunidades destacan las KChIPs. De hecho, en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, los mRNA de  $K_v4.3$  y KChIP3 son abundantes y controlan la densidad de la corriente y la frecuencia de disparo de la  $I_A$  [197]. También se ha observado que ratones *knockout* para KChIP3 presentan una reducción moderada en la magnitud de la  $I_A$  en células granulares del hipocampo, lo que resulta en una mayor potenciación a largo plazo de las sinapsis [123]. Además, KChIP3 en las células estrelladas del cerebelo regula las propiedades biofísicas de la  $I_A$  de manera calcio-dependiente [198]. En las interneuronas del hipocampo es KChIP1 quien regula la frecuencia de disparo y la recuperación de la inactivación de la corriente  $I_A$  [199, 200]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los complejos  $K_v4$ -KChIP tampoco son capaces de reconstruir las características de la  $I_A$ , por lo que se han descrito otras proteínas moduladoras conocidas como DPPLs. DPP6 y DPP10 se asocian con los canales  $K_v4$  facilitando su expresión en superficie y modificando la cinética del canal. Ambas son glicoproteínas integrales de membrana que están ampliamente expresadas en cerebro. DPP6 tiene elevados niveles de expresión en hipocampo, estriado y tálamo, mientras que DPP10 es predominante en córtex, bulbo olfatorio y cerebelo [201-204]. En áreas cerebrales donde los patrones de expresión de  $K_v4$ , KChIP y DPL se superponen, se forman complejos ternarios que contribuyen a formar la  $I_A$  nativa, lo que explica la variabilidad de la corriente  $I_A$  en las diferentes regiones cerebrales. Por ejemplo, en las neuronas piramidales CA1 del hipocampo, la corriente forma un gradiente con mayor nivel en las dendritas que disminuye hacia el soma, y esto se relaciona con los niveles de expresión de KChIP1 [205, 206]. En neuronas dopaminérgicas existe una fuerte correlación entre los niveles de  $K_v4.3$  y KChIP3 y la densidad de la corriente  $I_A$  [197].

La corriente  $I_A$  tiene un papel fundamental en la regulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo, ya que controla los potenciales de membrana que detectan los receptores de NMDA. Estos receptores están regulados por ligando pero también por voltaje y median el proceso conocido como potenciación a largo plazo. Además, la corriente  $I_A$  regula la despolarización local de la membrana en las espinas dendríticas y los efectos de la retro-propagación de los potenciales de acción en las mismas [60, 207, 208]. Alteraciones en la corriente  $I_A$  se han asociado con epilepsia del lóbulo temporal en humanos. En modelos animales, se ha observado que los rasgos iniciales de la epilepsia se inducen por un incremento de la excitabilidad neuronal, que se corresponde con una disminución en la  $I_A$  causada, a su vez, por una bajada en la densidad de los canales  $K_v4.2$  [201]. También se ha demostrado que los pacientes con epilepsia crónica muestran bajos niveles de proteína KChIP3 en el hipocampo, lo que también se traduce en una disminución de la  $I_A$  [209-212].

### 1.8 FARMACOLOGÍA DE LOS CANALES $K_v4.3$ .

Las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$  están implicadas en múltiples patologías, de ahí que se consideren una diana terapéutica importante para el tratamiento de las mismas. Existen numerosos

fármacos capaces de bloquear los canales  $K_{v4.3}$  sin embargo, la mayoría de ellos no son específicos de canales  $K_{v4}$ . Cabe destacar, que puesto que en condiciones fisiológicas los canales  $K_{v4.3}$  están íntimamente asociados a las subunidades KChIP, el efecto de los fármacos sobre ellos se ve influenciado por la presencia de estas subunidades. En general, la característica farmacológica principal de los canales  $K_{v4.3}$  es que son sensibles al bloqueo por 4-aminopiridina e insensibles a TEA en ausencia de subunidades moduladoras [213-215].

El principal efecto adverso de los anestésicos locales es que tienen una elevada cardiotoxicidad debido a que son capaces de inhibir las corrientes generadas por muchos canales iónicos, entre ellos los canales  $K_{v4.3}$ . Este es el caso de la bupivacaína, la ropivacaína y la levobupivacaína que bloquean la  $I_{to}$  de manera dosis dependiente y reversible [216-218]. Existen agentes antiarrítmicos como la propafenona, la quinidina y la flecainida capaces también de inhibir la corriente  $I_{to}$  [219, 220]. Las dihidropiridinas, como la nifedipina y la nicardipina, son también capaces de bloquear los canales  $K_{v4.3}$  de forma concentración-dependiente [221, 222]. El irbesartan bloquea el estado abierto del canal [223]. El celecoxib, el diltiazemo y la nicotina inhiben los canales  $K_{v4.3}$  y su uso aumenta el riesgo cardiovascular y de muerte súbita [224]. El tamoxifeno tiene efectos cardioprotectores [225]. La sibutramina inhibe la corriente de  $K_{v4.3}$  de forma dosis-dependiente [226]. Los ácidos grasos polinsaturados pueden inhibir la corriente generada por los canales  $K_{v4}$ , y sus efectos dependen de la presencia de KChIPs [227, 228].

Hasta la fecha, los únicos compuestos capaces de inhibir selectivamente los canales  $K_{v4}$  son algunas toxinas de la araña *Heteropoda venatoria* entre las que destacan la heteropodatoxina 2 (HpTx2) y su homóloga la heteropodatoxina 3 (HpTx3) [229, 230]. La HpTx2 tiene el doble de afinidad por los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2b que por  $K_{v4.3}$  solo, sugiriendo que la estabilización del estado cerrado de  $K_{v4.3}$  que provocan las subunidades KChIP incrementan la afinidad de la toxina [231, 232]. También existen toxinas de escorpión que bloquean específicamente la corriente  $I_A$  en neuronas [233].

En los últimos años se ha identificado un compuesto que funciona como activador de los canales  $K_{v4}$  pero solo en presencia de KChIPs. Se conoce como NS5806 y modula la cinética de la corriente, aumentando la magnitud de la misma. Parece ser que este fármaco se une a la interfaz entre el extremo amino-terminal de  $K_{v4.3}$  y el carboxi-terminal de KChIP3, estabilizando el complejo y potenciando su actividad [234-237]. Existe otro compuesto, el CL888, que también es capaz de afectar a la unión entre  $K_{v4.3}$  y KChIP1, pero en este caso dificulta su asociación de manera que actúa como un inhibidor de la corriente [238].

## 1.9. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON Y CANALES DE POTASIO.

La enfermedad de Huntington (HD) es un desorden neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por anomalías motoras, disminución cognitiva y problemas psiquiátricos [239-245]. La neuropatología de la enfermedad se caracteriza por la disfunción y muerte de neuronas específicas dentro del cerebro [246, 247]. Concretamente, las neuronas del cuerpo estriado son las más susceptibles

a la enfermedad. También se ven afectadas en la mayoría de los casos la región CA1 del hipocampo, la sustancia negra y en menor medida, otras áreas cerebrales [248-251]. Aunque las alteraciones en el sistema nervioso central son el rasgo clínico característico de la enfermedad de Huntington, los pacientes también sufren daños inmunes y metabólicos, debilidad muscular, pérdida de peso, fallo cardíaco, atrofia testicular y osteoporosis [252-254]. El curso de la enfermedad es bastante largo comparado con otros desórdenes neurodegenerativos. Normalmente los pacientes mueren a los 20 años de aparecer los primeros síntomas de la enfermedad, en muchos casos debido a una neumonía fatal [255]. La segunda causa de muerte más común en los pacientes con Huntington es el fallo cardíaco [256].

La causa genética de la enfermedad es la repetición de un triplete de nucleótidos (CAG) en el exón 1 del gen HD que codifica para la proteína huntingtina (Htt) [257, 258]. Como consecuencia se forma una gran cola de poliglutamina en el extremo amino-terminal de la proteína, dando lugar a la proteína mutada (mHtt) [259]. En la población sana, el triplete CAG se repite entre 9 y 35 veces [260, 261]. Cuando se superan las 35 repeticiones se da lugar a la enfermedad. La cantidad de repeticiones se asocia a la edad de aparición de los primeros síntomas. Así, la aparición de la enfermedad entre los 30 y los 50 años se debe a repeticiones en torno a 40-49. Cuando existen más de 50 repeticiones CAG en la proteína, el HD se desarrolla sobre los 20-30 años [262, 263]. En un 5% de los casos se da el conocido como Huntington juvenil que se caracteriza porque aparece antes de los 21 años y las repeticiones están por encima de 60 [264-267]. Sin embargo, la longitud del extremo amino-terminal no está relacionada con el desarrollo de la enfermedad desde el momento de su aparición. La huntingtina tiene una expresión ubicua tanto en el cerebro como en tejidos periféricos; de hecho, es fundamental para el desarrollo cerebral, la división celular, participa en el tráfico de vesículas y en la endocitosis, regula la transcripción de múltiples genes y mantiene la morfología tisular y celular [255, 268-271]. Sin embargo, cuando la huntingtina mutada sufre proteólisis, se generan fragmentos que contienen los extremos amino-terminal con las colas de poliglutamina. Estos fragmentos proteicos desplegados se translocan al núcleo donde forman agregados que interfieren con las funciones celulares y parecen ser la causa de la muerte neuronal [272-277].

Usando modelos animales de Huntington, se ha demostrado que los astrocitos del cuerpo estriado que presentan huntingtina mutada, tienen alterada la actividad de los canales Kir4.1 y la homeostasis de  $K^+$  extracelular, por lo que las neuronas de esta región cerebral son hiperexcitables, lo que contribuye al desarrollo de los síntomas motores propios del HD [278-280]. Estas alteraciones en Kir4.1 y en la homeostasis de  $K^+$  también se han observado en modelos de Alzheimer [281].

Por otro lado, en la enfermedad de Huntington, las neuronas que más sufren la degeneración son las neuronas espinales del cuerpo estriado (MSNs) [250]. Los canales de  $K^+$  son fundamentales para mantener la integridad sináptica, y la disminución de estos canales puede afectar a la capacidad de estas neuronas para integrar las sinapsis de entrada [282]. Se ha descrito que la corriente fundamental para regular la plasticidad sináptica en las MSNs es la corriente  $I_A$  [283]. De hecho, se ha descrito que en la enfermedad de Parkinson se produce una disminución de la  $I_A$  en estas neuronas [284].



## **2 OBJETIVOS**

Los canales de potasio regulados por voltaje ( $K_v$ ) son proteínas de membrana finamente moduladas por múltiples procesos fisiológicos, patológicos y farmacológicos [285]. Los canales  $K_v4.3$  pertenecen a la superfamilia de canales  $K_v$  y son responsables de la corriente somatodendrítica de tipo A en neuronas ( $I_A$  o  $I_{SA}$ ) y de la corriente transitoria de salida ( $I_{to}$ ) en miocitos cardiacos [62]. Debido a esto, están implicados en el desarrollo de múltiples patologías que van desde diversos tipos de arritmias cardiacas a distintos tipos de ataxias o epilepsias [172, 174, 178, 179, 210, 212].

Las proteínas de interacción con canales de potasio o KChIPs pertenecen a la subfamilia de sensores neuronales al  $Ca^{2+}$  (NCS). Entre ellas destaca KChIP3, también conocida como DREAM o calsenilina, por desempeñar distintas funciones según su localización celular. Actúa como un represor transcripcional dependiente de  $Ca^{2+}$  y regula la transcripción de multitud de genes implicados en la homeostasis del  $Ca^{2+}$ . También es capaz de interactuar con los canales  $K_v4$  y regular sus propiedades cinéticas [90].

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo causado por la expansión de tripletes CAG en el gen de la proteína huntingtina. Se caracteriza porque los síntomas aparecen tiempo después de que el daño neuronal haya comenzado [255, 286]. Esto podría deberse a la activación de mecanismos neuroprotectores endógenos. Dentro de estos mecanismos se incluye la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), que se activa en el retículo endoplásmico en respuesta a proteínas mal plegadas, estrés oxidativo o cambios en la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , entre otros. La respuesta UPR es un proceso complejo que incluye múltiples vías de señalización. Una de estas vías está mediada por el factor ATF6 [287]. Se ha demostrado que en modelos animales así como en pacientes con Huntington el procesamiento y por tanto, la actividad de ATF6 está disminuido [288].

La **Hipótesis** de la presente Tesis Doctoral es que DREAM tiene un papel neuroprotector en las enfermedades neurodegenerativas, en concreto, en Huntington; de manera que determinados compuestos podrían interactuar de forma selectiva con esta KChIP bloqueando sus efectos sobre los canales  $K_v4.3$  y potenciando la neuroprotección. De manera extensible consideramos que los niveles de KChIP2 pueden aumentar el riesgo de padecer determinadas patologías cardiacas.

El **Objetivo Principal** de la presente Tesis Doctoral es analizar los efectos de los compuestos Repaglinida y CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$  ensamblados o no con subunidades reguladoras en un sistema heterólogo.

Con el fin de lograr este objetivo, nuestros **objetivos específicos** son analizar:

- Los efectos electrofisiológicos de Repaglinida sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.

## Objetivos

---

- Los efectos electrofisiológicos de CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.
- La selectividad de Repaglinida y CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES.

Todos los experimentos presentados en la presente Tesis Doctoral siguen las normas del NIH (Guide for the care and use of laboratory animals; NIH publications number 23-80) revisadas en 2011; así como las del Parlamento Europeo 2010/63/EU y la normativa de la Declaración de Helsinki.

#### 3.1.1. Características de las células CHO.

Todos los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo utilizando células CHO. La línea celular CHO procede de células de ovario de hámster chino (*Chinese hamster ovary*). Las células de esta línea expresan de forma endógena canales de Na<sup>+</sup> sin embargo, la corriente que generan es de muy pequeña magnitud, de manera que no interfiere con las corrientes de K<sup>+</sup> que son objeto de la presente Tesis Doctoral [289, 290]. Por tanto, esta línea celular es un buen modelo para el estudio de canales de potasio ya que, a diferencia de otras líneas como la HEK293, carece de otras corrientes endógenas que puedan alterar los resultados [291].

#### 3.1.2. Cultivos celulares de células CHO.

Las células CHO fueron cultivadas en medio Iscove (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de FBS, antibióticos al 1% (100 IU/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina) y L-glutamina al 1% (todo procedente de Gibco). Se incubaron en placas de 35mm a 37°C en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo celular se cambiaba cada 2-3 días y las células se tripsinizaban (TrypLE™ Express, Life Technologies) cada 5-6 días. Posteriormente, se transfirieron a un tubo de 15ml y se centrifugaron durante 5min a 327g. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio y se sembraron en placas en distintas proporciones para su posterior transfección.

#### 3.1.3. Transfección en células CHO.

Para los estudios electrofisiológicos, las células CHO fueron transfectadas transitoriamente mediante Eugene 6 (Promega), utilizando el protocolo estándar recomendado por el fabricante. Para los experimentos realizados con K<sub>v</sub>4.3 sólo, se emplearon 3 µl de Eugene 6 (en una proporción 3:1 con respecto a la cantidad total de cDNA que deseamos transfectar), 1 µl del vector que contiene el cDNA de K<sub>v</sub>4.3 (clonado en el vector de expresión pEGFPn1, proporcionado por el Dr. D.J. Snyders de la Universidad de Amberes, Bélgica) y 0.5 µl del plásmido EBO-pcDLeu2 que nos servirá como marcador de las células transfectadas ya que codifica para el antígeno de superficie CD8. Las células que han incorporado el vector, expresarán el antígeno CD8 y, en su mayoría, expresarán también el canal transfectado. Para los experimentos realizados con K<sub>v</sub>4.3 y la subunidad reguladora KChIP3, se utilizaron 7.5 µl de Eugene 6 junto con 0.5 µl del vector con el cDNA de K<sub>v</sub>4.3 y 1.5µl del vector que contiene el cDNA de KChIP3 (clonado en el vector de expresión pcDNA3.1, proporcionado por el Dr. J.R. Naranjo del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España). Además se añadieron 0.5 µl del plásmido EBO-pcDLeu2.

En todos los casos, la mezcla de transfección se preparó en un medio libre de suero y de antibióticos, dejándola reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió a placas sembradas con las células en torno a un 60% de confluencia. Tras 48 h en las que se dejaron crecer las células en condiciones estándar, se incubaron durante 5 min con Dynabeads M450 (Dyna, Invitrogen Co) que son microesferas de poliestireno unidas al anticuerpo anti-CD8 que nos sirven para seleccionar las células transfectadas [292-295]. Posteriormente, las células se recogieron siguiendo el procedimiento habitual. Tras 45-60 min a temperatura ambiente se llevaron a cabo los experimentos electrofisiológicos durante un tiempo no superior a 12 horas.

### 3.1.4. Línea celular estable para K<sub>v</sub>4.3-KChIP2c.

Para realizar los experimentos correspondientes a los complejos K<sub>v</sub>4.3-KChIP2c se empleó una línea celular CHO que expresa de forma estable el canal K<sub>v</sub>4.3 junto con la subunidad reguladora KChIP2c. El vector empleado fue pcDNA3.1. La isoforma de K<sub>v</sub>4.3 clonada fue hK<sub>v</sub>4.3L. Este vector lleva además un gen codificante de resistencia al antibiótico zeocina incorporado en el DNA codificante de KChIP2c.

Para su cultivo se utilizó el medio celular Iscove (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de FBS y L-glutamina al 1% (Gibco). En este caso utilizamos el antibiótico neomicina (G418 de Sigma Aldrich) a una concentración de 250 mg/0.5 l. Además, esta línea celular requiere la presencia del antibiótico zeocina (Invitrogen) que se utiliza como antibiótico de selección (0.3%) y que es sensible a la luz. Tanto el medio de cultivo como las placas con las células se mantuvieron protegidos de la luz. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar confluencia en torno al 80%. Posteriormente se recogieron mediante el proceso habitual y transcurridos 45-60 min a temperatura ambiente se procedió a realizar los experimentos de electrofisiología. Las células supervivientes serán las que hayan incorporado el vector y, por tanto, serán resistentes a zeocina. De esta forma, todas las corrientes que registremos se corresponderán a los complejos K<sub>v</sub>4.3-KChIP2c.

## 3.2. ELECTROFISIOLOGÍA.

### 3.2.1. Técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (*Patch-Clamp*).

La técnica de *patch-clamp* fue utilizada por primera vez para medir la corriente generada a través de un único canal de acetilcolina en parches de membrana en células del músculo esquelético de rana [296]. Esta técnica permite, simultáneamente, fijar el potencial de membrana y registrar la corriente generada por el/los canales dependientes de voltaje o de ligando presentes en la membrana tras aplicar un pulso de voltaje o el ligando correspondiente a dicho canal. Este método es un refinamiento de la técnica de fijación de voltaje que utiliza como electrodo una micropipeta de vidrio con una punta muy fina en torno a 1-4 µm.

Se han desarrollado varias configuraciones de la técnica de *patch-clamp* (Figura 11) [4]:

- Configuración de parche sobre célula entera (*on-cell patch*).

- Configuración de célula entera (*whole-cell patch*).
- Configuración de parche interior-fuera (*inside-out patch*).
- Configuración de parche exterior-fuera (*outside-out patch*).

La configuración más empleada cuando se quieren estudiar las corrientes iónicas generadas tras la activación de todos los canales presentes en la membrana de una célula es la configuración de célula entera (*whole cell*) [297]. Esta es la técnica utilizada en la presente Tesis Doctoral y nos permite una continuidad entre el espacio intracelular y la solución de la micropipeta.

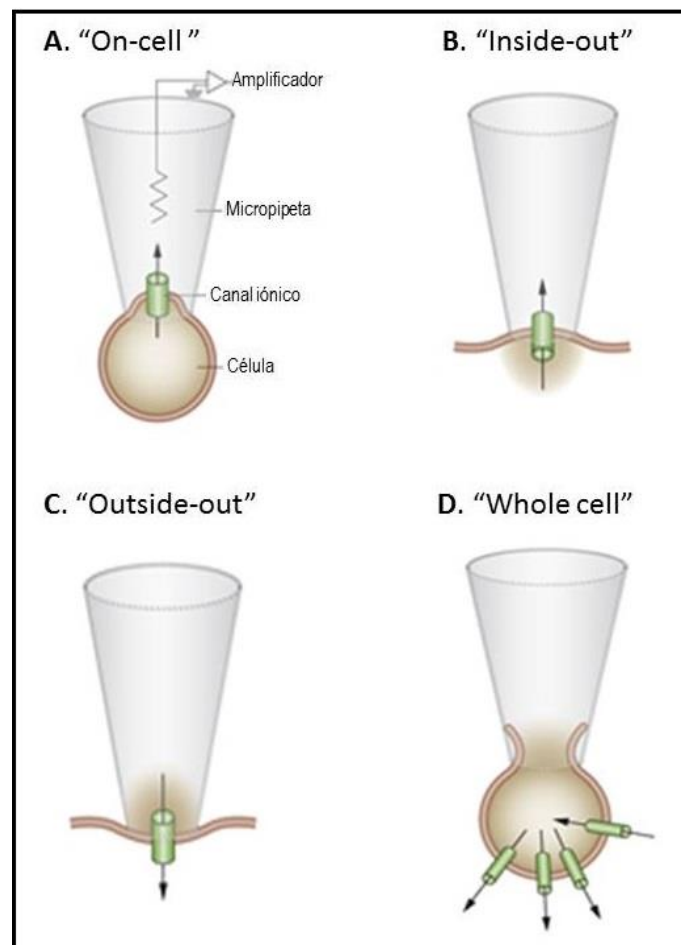


Figura 11. Representación esquemática de las distintas configuraciones de la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (*patch-clamp*). Modificado de Frances M. Ashcroft and Patrik Rorsman, 2013. [4]

Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia entre la luz de una micropipeta de vidrio que contiene un electrodo en su interior y la membrana de una célula aislada. La micropipeta se llena con una solución conocida como "solución interna" cuya composición varía según la corriente a estudiar y contiene tanto iones inorgánicos como mediadores celulares, con el fin de simular el medio

intracelular para obtener un ambiente idóneo para registrar la corriente en estudio. Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana se aplica presión negativa mediante una ligera succión de tal manera que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma un sello de alta resistencia (del orden de  $G\Omega$ ) entre la micropipeta y la membrana. Esta configuración de *patch clamp* se conoce como configuración de parche sobre célula entera (*on-cell patch-clamp*) y permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica (i), que es la generada por la activación de un único canal presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro posibles, ya que no modifica el medio intracelular, y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el potencial de membrana, un indicador de la situación fisiológica de la célula, ya que los valores a los que se fija el potencial de membrana son relativos al potencial de membrana real de la célula.

A partir de esta configuración de parche sobre célula entera, aplicando una ligera succión adicional, se puede romper el sello de alta resistencia y conseguir la configuración de célula entera (*whole-cell patch-clamp*). Tras la rotura del parche de membrana, la solución interna que contiene la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular, y al ser mucho mayor el volumen de la solución interna de la micropipeta que el volumen celular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo. En estas condiciones es posible fijar el potencial de membrana al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica. Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores celulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos.

Partiendo también de la configuración de parche sobre célula entera se puede elevar la célula del fondo del baño y separar el parche de membrana que está incluido en la micropipeta del resto de la célula. De esta forma queda el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Esta es la configuración de parche de membrana interior-fuera (*inside-out patch*). A partir de la configuración de célula entera se consigue la configuración de parche exterior-fuera (*outside-out patch*). En este caso, es la cara extracelular de la membrana la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones se conocen también como configuraciones de parches escindidos y permiten el registro de la corriente microscópica o unitaria. Son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores pero presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.



### 3.2.2. Soluciones empleadas.

La composición de la solución externa con la que se perfundieron las células y de la solución interna con la que se llenaron las micropipetas en todos los experimentos realizados, se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Composición (mM) de las soluciones externa e interna** empleadas en los experimentos de electrofisiología.

Solución externa		Solución interna	
NaCl	145.0	Aspartato-K	80.0
KCl	4.0	KCl	42.0
CaCl <sub>2</sub>	1.8	Fosfocreatina	3.0
MgCl <sub>2</sub>	1.0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0
HEPES-Na	10.0	ATP-Mg	3.0
Glucosa	10.0	HEPES-K	5.0
		EGTA-K	5.0
pH=7.4 (ajustado con NaOH)		pH=7.25 (ajustado con KOH)	

### 3.2.3. Registro de las corrientes iónicas.

Para el registro de las corrientes iónicas, las células en suspensión transfectadas se colocaron en una cámara de 0.5 ml montada sobre la platina de un microscopio invertido (Modelo Eclipse TS-2000, Nikon). Tras un periodo de 15 a 25 min, necesarios para que las células se asentaran en el fondo de la cámara, las células se perfundieron con la solución externa a una velocidad de 1 ml/min.

Las corrientes se registraron a temperatura ambiente (22-25°C) utilizando la configuración de célula entera de la técnica de *patch-clamp* [297]. Para ello se empleó un amplificador de *patch-clamp* Axopatch-200B conectado a un conversor analógico-digital (Digidata 1322A) de 16 bits. La adquisición de los datos y la génesis de los protocolos experimentales se controlaron mediante la utilidad Clampex del programa PClamp 9.0.1 (Molecular Devices). Las corrientes se filtraron a 1 kHz, se muestrearon a una frecuencia de 2 kHz (filtro Bessel de 4 polos), y se almacenaron en el disco duro de un ordenador HP para su posterior análisis. El análisis de los datos se realizó mediante la herramienta Clampfit del programa PClamp 9.0.1 (Molecular Devices), Excel 2010 (Microsoft) y Origin 9 (OriginLab Co.).

Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (modelo GD-1, Narishige) utilizando un estirador o "puller" horizontal programable (modelo P-87, Sutter Instrument Co.). Posteriormente, se pulieron con una microforja MF-83 (Narishige). La resistencia de la punta de las

mismas, rellenas con solución interna y en contacto con la solución externa, era de 2.5-5 MΩ. Las micropipetas, rellenas de solución interna, se acercaron a la membrana de las células utilizando un micromanipulador hidráulico MHW-3 (Narishige) con el fin de obtener un sello de alta resistencia (2-5 GΩ; n = 20). Tras la formación del sello, las células se levantaron del fondo de la cámara y la porción de membrana (parche) incluida en el interior de la pipeta se rompió mediante una breve succión adicional para conseguir la configuración de célula entera (*whole-cell patch-clamp*). La capacitancia y las resistencias en serie se compensaban en todos los experimentos, alcanzándose un valor aproximado de compensación del 80% de la resistencia de acceso efectiva ( $R_a$ ). En las células CHO la capacitancia de la membrana ( $C_m$ ) fue de  $14.1 \pm 1.3$  pF (n=17). La baja  $C_m$  de las células permitió la rápida fijación del voltaje y el error de voltaje no fue significativo (<5 mV).

### 3.2.4. Protocolos experimentales y análisis de los datos.

La corriente generada por los canales  $K_v4.3$  ensamblados o no con las subunidad moduladoras se registró en ausencia (situación control) y en presencia de los fármacos a analizar. El potencial de membrana (*holding*) se mantuvo a -80 mV y los diferentes protocolos experimentales se aplicaron cada 10 s (a una frecuencia de 0.01 Hz), de tal forma que nos asegurábamos una completa recuperación de la inactivación de la corriente, evitando así una acumulación de este proceso.

El protocolo utilizado para obtener la relación corriente-voltaje (IV) y la curva de activación de la corriente consistía en la aplicación de pulsos despolarizantes de 250 ms de duración, desde -80 mV hasta +60 mV, en incrementos de 10 mV; seguidos de la repolarización del potencial de membrana durante otros 250 ms a -40 mV. La relación IV se obtuvo representando la amplitud de la corriente medida en el pico máximo de cada pulso despolarizante frente al potencial de membrana del pulso aplicado. El porcentaje de bloqueo producido por cada fármaco, se obtuvo calculando la disminución de la carga que cruzaba la membrana durante la aplicación de los pulsos despolarizantes de 250 ms de duración (estimada a partir de la carga integral de la corriente).

Las curvas de activación se obtuvieron representando la conductancia de los canales  $K_v4.3$  ( $G_{K_v4.3}$ ) frente al potencial de membrana del pulso despolarizante, y se ajustaron a la ecuación de Boltzman:

$$y = 1/[1 + \exp(-(E-E_h)/s)]$$

donde  $E$  representa el potencial de membrana,  $E_h$  el voltaje al cual el 50 % de los canales están activados, y  $s$  la pendiente de la curva de activación. En este caso, la conductancia se calculó mediante la Ley de Ohm modificada para los canales iónicos:

$$G_{K_v4.3} = I_{K_v4.3} / (E_m - E_{rev})$$

donde  $I_{K_v4.3}$  representa la corriente máxima registrada,  $E_m$  el potencial de membrana y  $E_{rev}$  el potencial de reversión del potasio en estos canales. El valor de  $E_{rev}$  utilizado fue -85 mV, valor calculado para estos mismos canales en condiciones experimentales similares [298].

La fracción de bloqueo se calculó comparando la amplitud máxima de la corriente en cada pulso despolarizante a +60 mV en situación control y en presencia del fármaco de acuerdo a la fórmula:

$$f = 1 - (I_{\text{Fármaco}} / I_{\text{Control}})$$

De este modo, la fracción de bloqueo obtenida para cada concentración de cada fármaco fue empleada para calcular el valor al cual el 50 % de los canales están bloqueados ( $CI_{50}$ ) así como el coeficiente de Hill ( $n_H$ ), ajustando estos valores a una ecuación de Hill:

$$f = 1 / [1 + (CI_{50} / [F])^{n_H}]$$

donde  $f$  representa la fracción del bloqueo producido por el fármaco,  $[F]$  la concentración de fármaco utilizada y  $n_H$  el coeficiente de Hill [299, 300].

El curso temporal de los procesos de activación e inactivación fue obtenido tras ajustar los trazos de corriente obtenidos tras la aplicación de los pulsos despolarizantes a +60 y 0 mV. La activación se ajustó a un proceso monoexponencial, mientras que el proceso de inactivación resultó ser biexponencial. En ambos casos, utilizamos la ecuación:

$$y = A_1 e^{(-t/\tau_1 x)} + A_2 e^{(-t/\tau_2 x) + C}$$

donde  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son las constantes de tiempo de cada uno de los componentes,  $A_1$  y  $A_2$  son las amplitudes de cada componente de la exponencial y  $C$  es el valor basal.

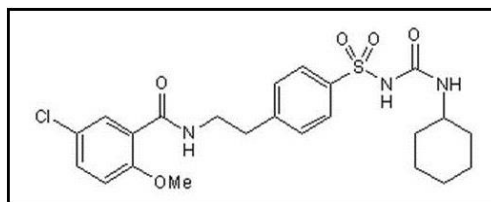
Para analizar la dependencia de voltaje de la inactivación de estos canales, se aplicaron pulsos despolarizantes desde un potencial de fijación de -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -120 y +60 mV, en incrementos de 10 mV. Entre -55 y -15 mV, rango de potenciales que corresponde al de la inactivación de los canales, los pulsos fueron aplicados en incrementos de 5 mV. Posteriormente, se aplicaba un segundo pulso a +50 mV de este modo, cuanto más positivo era el prepulso aplicado, mayor era el grado de inactivación y, por tanto, menor la amplitud de la corriente en el segundo pulso aplicado. La amplitud de la corriente generada por el segundo pulso a +50 mV, medida en el pico máximo, se representó frente al potencial de membrana del pulso inicial. Estos valores se ajustaron a una ecuación de Boltzmann, obteniendo así la curva de inactivación de la corriente. En este caso,  $E_h$  representa el punto medio de inactivación, es decir, el potencial en el cual el 50 % de los canales están inactivados y  $s$  representa la pendiente de la curva de inactivación.

El proceso de recuperación de la inactivación de los canales Kv4.3 ensamblados o no con KChIPs se analizó aplicando un protocolo de doble pulso. En primer lugar, se aplicaba un pulso condicionante desde un potencial de fijación de -80 mV a +60 mV durante 1 s para inducir la inactivación de los canales. Posteriormente, se aplicaba un pulso de duración variable a -90 mV, seguido de un pulso de prueba a +60 mV para determinar el grado de recuperación. Para analizar los resultados, se normalizó la amplitud máxima del pulso de prueba a la amplitud máxima del pulso condicionante correspondiente. Los datos se representaron frente al tiempo de recuperación, y se ajustó a una ecuación exponencial para conocer el curso temporal de recuperación de la inactivación de los canales.

### 3.3. COMPUESTOS EMPLEADOS.

#### 3.3.1. Glibenclamida.

La Glibenclamida, también conocida como gliburida, es una sulfonilurea ampliamente utilizada en el tratamiento de la *Diabetes mellitus* no dependiente de insulina (tipo II). La Glibenclamida actúa mediante la inhibición de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) presentes en células  $\beta$  pancreáticas y en cardiomiocitos [301]. Debido a sus efectos sobre los canales  $K_{ATP}$  de las células cardíacas, las sulfonilureas pueden contribuir a incrementar el riesgo cardiovascular y la mortalidad en pacientes tratados con diabetes de tipo II [302]. La Glibenclamida ejerce su efecto hipoglucémico favoreciendo la liberación de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas. Para ello, se une con alta afinidad, a una subunidad de los canales  $K_{ATP}$  conocida como receptor de sulfonilurea (SUR). En esta interacción parece ser fundamental el grupo benzeno presente en la molécula de Glibenclamida (Figura 12). Cuando la Glibenclamida ocupa el receptor, se inhibe el flujo de  $K^+$  a través del canal por lo que se despolariza la membrana y se induce la liberación de insulina. Existe una especificidad de tejido en cuanto a los receptores SUR: SUR1 se localiza en los canales  $K_{ATP}$  pancreáticos, SUR2A en los cardíacos y SUR2B en los vasculares [303-305]. A parte de en los canales  $K_{ATP}$ , las subunidades SUR sólo se han localizado en los canales  $K_v1.3$  de conejo [306]. La Glibenclamida se une a los canales  $K_{ATP}$  con una  $Cl_{50}$  en torno a 0.1-1  $\mu M$  [303].



**Figura 12. Estructura molecular de la Glibenclamida.**

La Glibenclamida se utilizó en la presente Tesis Doctoral como un control negativo, ya que no tiene efectos sobre los canales  $K_v$ .

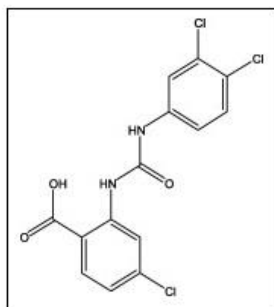
Para la realización de los experimentos se hizo una solución stock de Glibenclamida a una concentración de 1 mM en DMSO ( $C_2H_6OS$ ) y posteriormente se hicieron diluciones en la solución externa para conseguir las concentraciones de trabajo deseadas.

#### 3.3.2. CL-888.

El CL-888 es el ácido 4-cloro-2 [3-(3,4-dicloro-fenil) ureido] benzoico (Figura 13). Este compuesto fue identificado utilizando la técnica del doble híbrido de levadura o YTH (*Yeast Two Hybrid*) utilizada para detectar posibles interacciones entre dos proteínas. Los únicos estudios realizados hasta la fecha demostraron que el CL-888 es capaz de unirse a KChIP1 y modular la conformación y la función del canal. Los experimentos electrofisiológicos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban

hK<sub>v</sub>4.3 junto a hKChIP1 mostraron que el compuesto reduce el pico de la corriente así como la recuperación de la inactivación de la misma de manera significativa. Sin embargo, cuando se realizaban los mismos experimentos en ovocitos que expresaban hK<sub>v</sub>4.3 solo, los efectos sobre la corriente eran mucho menos pronunciados. Los mismos resultados se obtuvieron en cultivos de neuronas granulares cerebrales (CGN). En este estudio, los autores proponen que el sitio de unión del CL-888 en KChIP1 parece encontrarse cerca de un residuo de triptófano (Trp129) localizado en un pequeño surco hidrofóbico de la molécula de KChIP1 [238]. Debido al alto grado de homología entre las distintas isoformas de la familia de subunidades KChIP, esperaríamos que el CL-888 afecte de manera similar a los complejos formados por K<sub>v</sub>4.3 y otras KChIPs.

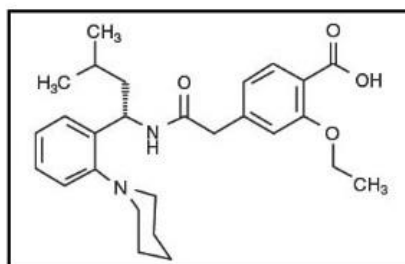
En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos del CL-888 sobre los complejos K<sub>v</sub>4.3-KChIP2c, K<sub>v</sub>4.3-KChIP3 así como en K<sub>v</sub>4.3 sólo. Para ello preparamos una solución stock de CL-888 en DMSO a 10 µM y a partir de ella hicimos diluciones en la solución externa para conseguir las concentraciones de trabajo.



**Figura 13. Estructura molecular del compuesto CL-888.** Tomado de Bowlby et al, 2005. [238]

### 3.3.3. Repaglinida.

La Repaglinida es un fármaco perteneciente a la familia de las Meglitinidas, ampliamente utilizada como antidiabético oral. Se diferencia de las sulfonilureas como la Glibenclamida en que no posee el motivo sulfonilurea. Químicamente, su estructura está basada en el ácido benzoico (Figura 14) [307]. Junto a la Nateglinida constituye el grupo de secretagogos de insulina de acción corta denominados “reguladores de la glucosa pandrial” [308].



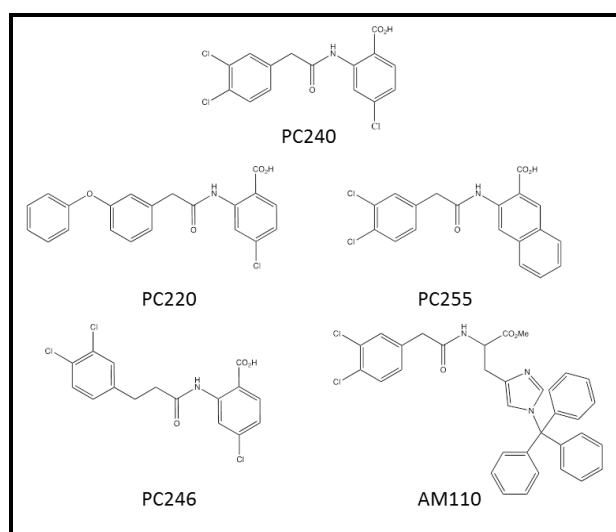
**Figura 14. Estructura molecular de la Repaglinida.**

La Repaglinida está indicada en el tratamiento de la *diabetes mellitus* de tipo 2 cuya hipoglucemia no pueda seguir siendo controlada satisfactoriamente por medio de dieta, ejercicio y reducción de peso. También se emplea en combinación con Metformina cuando el tratamiento con Repaglinida no es suficiente para regular los niveles de glucosa en sangre. Actúa inhibiendo los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) en las células  $\beta$ -pancreáticas, por lo que produce una despolarización de la membrana de estas células y la consiguiente apertura de los canales de calcio. El aumento de calcio intracelular favorece la segregación de insulina en estas células [309-311]. Se ha demostrado que se trata de un agente insulínico altamente potente con una  $CI_{50}$  en torno a 10 nM para el cierre de los canales  $K_{ATP}$  [312-314]. Desde un punto de vista metabólico, la Repaglinida se caracteriza porque se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, lo que conduce a un rápido incremento en su concentración plasmática. Su vida media en sangre es inferior a una hora. Se metaboliza en el hígado y no se conocen metabolitos intermedios derivados capaces de producir efectos hipoglucémicos, lo que supone una ventaja en relación a otros antidiabéticos. Se elimina principalmente en la bilis y muy poco por riñón, lo que también la hace muy recomendable en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 en pacientes que tengan disminuida la función renal, siempre previo ajuste correcto de la dosis [315].

En esta Tesis Doctoral se han estudiado los efectos de la Repaglinida sobre los complejos  $K_v4.3$ -KChIP2c,  $K_v4.3$ -KChIP3 así como en  $K_v4.3$  sólo. Para ello, se preparó una solución stock a 10  $\mu$ M en DMSO y se realizaron las diluciones correspondientes en la solución externa.

### 3.3.4. Compuestos sintéticos derivados del CL-888.

En el Instituto de Química Médica, el equipo de la Dra. Marta Gutiérrez, utilizando como base la estructura química del CL-888 diseñó el compuesto PC240. A partir del mismo se diseñó toda la batería de compuestos que se muestra en la Figura 15. El objetivo era la obtención de una molécula más potente y selectiva frente a KChIP3.



**Figura 15. Estructura molecular de los compuestos PC240, PC220, PC255, PC246 y AM110.**

En esta Tesis Doctoral se estudiaron los efectos de los compuestos PC240, PC246, PC220, PC255 y AM110 a una concentración estándar de 10 nM sobre las características electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3. Para ello se prepararon soluciones stock de cada uno de ellos a una concentración de 1  $\mu$ M en DMSO a partir de la cual se obtuvo la dilución de trabajo en la solución externa.

#### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

En cada serie de experimentos se calculó la media, la desviación estándar y el error estándar de la media (E.E.M.). En todos los casos los datos se expresaron como la media  $\pm$  E.E.M. para un determinado número (n) de experimentos.

Para la comparación entre los valores control y los obtenidos con los diferentes fármacos ensayados se empleó la prueba de comparación de resultados pareados t de Student, considerándose significativas aquellas diferencias para las que el valor de p resultó ser menor de 0.05. Para analizar el bloqueo a distintos voltajes, a diferentes concentraciones de los fármacos ensayados y para comparar resultados entre más de dos grupos de experimentos se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA).

## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS CANALES $K_v4.3$ .

Las principales características electrofisiológicas de las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$  expresados de forma transitoria en células CHO se muestran en la Figura 16. El protocolo empleado para el registro de las corrientes iónicas consistió en la aplicación de pulsos despolarizantes desde -80 mV a +60 mV, en incrementos de 10 mV cada 10 s. Tras la aplicación de pulsos positivos a -40 mV se genera la activación de una corriente de salida de  $K^+$ , rápida y transitoria que es de mayor amplitud cuanto más positivo es el pulso despolarizante aplicado (Figura 16A). La Figura 16B representa la relación corriente-voltaje (IV) tras medir el pico máximo de la corriente  $K_v4.3$  con un protocolo como el mostrado en la Figura 16A.

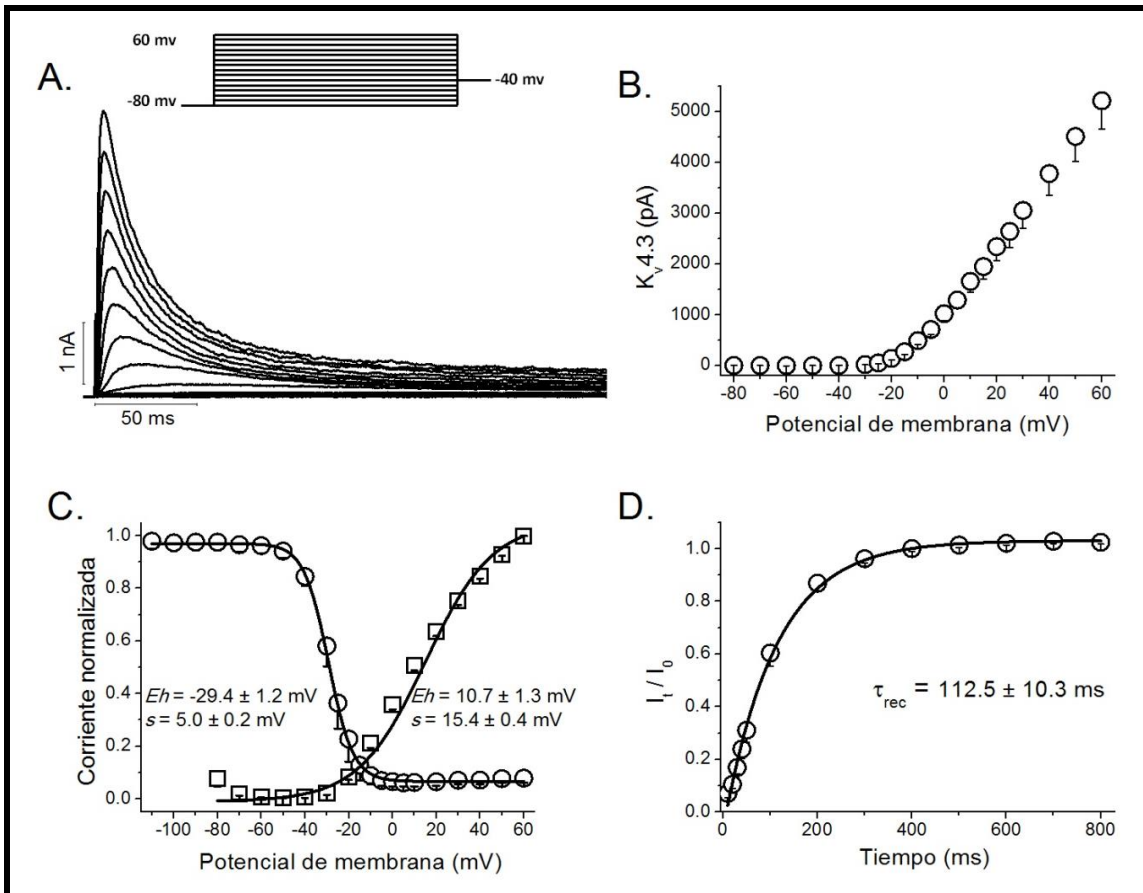
Tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 250 ms de duración, los canales se activan de forma muy rápida y posteriormente se inactivan también de forma rápida pero incompleta. Así, generan una corriente de activación e inactivación rápidas. El proceso de activación se ajusta a una función monoexponencial con una constante de tiempo de activación ( $\tau_{Act}$ ) de  $1.2 \pm 0.1$  ms ( $n=19$ ) y de  $6.6 \pm 0.7$  ms ( $n=19$ ) medido tras aplicar pulsos despolarizantes a +60 mV y a 0 mV, respectivamente (Tabla 3). En cuanto al tiempo necesario para alcanzar la magnitud máxima de la corriente en este caso fue de  $4.5 \pm 0.6$  ms a +60 mV (Tabla 3).

El proceso de inactivación, tras la aplicación de un pulso depolarizante a +60 mV, se ajusta a una ecuación biexponencial. La constante de tiempo de inactivación rápida ( $\tau_{inac,fast}$ ) de los canales  $K_v4.3$  fue de  $20.1 \pm 1.5$  ms, mientras que la constante de tiempo de inactivación lenta ( $\tau_{inac,slow}$ ) tuvo un valor de  $74.2 \pm 4.7$  ms ( $n=15$ ). El componente lento de la inactivación contribuyó en un  $40.0 \pm 4.4$  % ( $n=15$ ) (relación  $A_s/(A_s+A_f) \times 100$ ) al proceso total de inactivación de los canales  $K_v4.3$ , mientras que el componente rápido contribuyó en un  $60.0 \pm 4.4$  % ( $n=15$ ) (relación  $A_f/(A_s+ A_f) \times 100$ ) a dicho proceso (Tabla 4).

Con el fin de determinar la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $K_v4.3$  se aplicó un protocolo de doble pulso consistente en un prepulso hiperpolarizante o despolarizante en un rango de potencial de voltaje comprendido entre -110 mV y +60 mV, seguido de un pulso de prueba a +50 mV. Cuanto más positivo es el prepulso aplicado, mayor porcentaje de canales  $K_v4.3$  se inactiva y, por tanto, menor es la amplitud de la corriente registrada en el pulso de prueba. La Figura 16C muestra la relación entre la amplitud de la corriente  $K_v4.3$  medida en el pico máximo del pulso de prueba frente al potencial de membrana del prepulso. Los valores así obtenidos se ajustaron a una ecuación de Boltzmann para obtener los valores correspondientes al punto medio de inactivación ( $E_h$ ) y a la pendiente de la curva de inactivación ( $s$ ), que alcanzaron una media de  $-29.4 \pm 1.2$  mV y de  $5.0 \pm 0.2$  mV, respectivamente ( $n=6$ ).

La Figura 16C también muestra la curva de activación de los canales  $K_v4.3$ . Para estos canales el valor del punto medio de activación ( $E_h$ ) fue de  $10.7 \pm 1.3$  mV y la pendiente ( $s$ ) de la curva de activación alcanzó un valor de  $15.4 \pm 0.4$  mV.

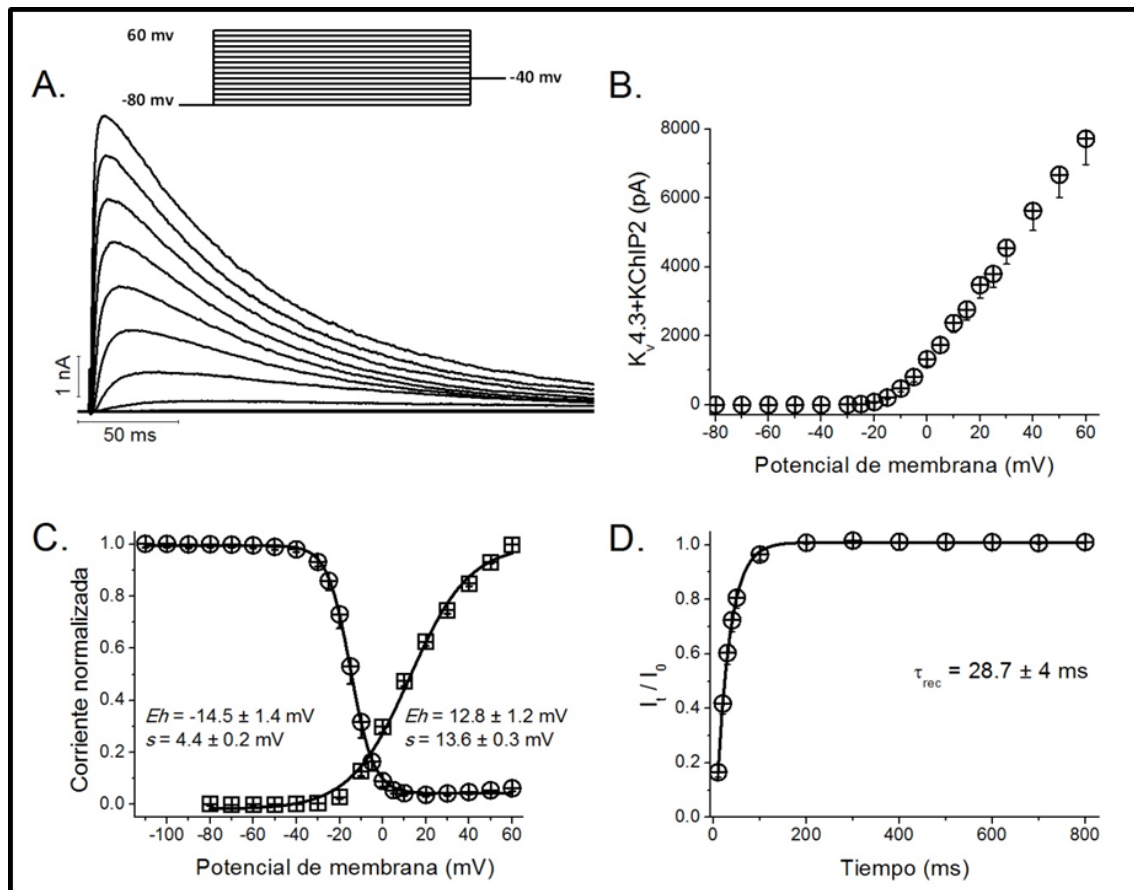
La recuperación de la inactivación se determinó aplicando un protocolo de doble pulso consistente, en este caso, en un prepulso de 1000 ms de duración a +60 mV, seguido de un pulso de prueba también a +60 mV pero de 250 ms de duración, aplicado tras un intervalo de tiempo variable desde el final del prepulso. La Figura 16D muestra la relación entre la magnitud de la corriente medida en el pico máximo del pulso de prueba ( $I_t$ ) y la del condicionante ( $I_0$ ) ( $I_t/I_0$ ) frente al tiempo entre el final del prepulso y el pulso de prueba. Los valores obtenidos se ajustaron a una ecuación monoexponencial, a partir de la cual obtuvimos la constante de tiempo de recuperación de la inactivación ( $\tau_{rec}$ ) de los canales  $K_v4.3$ , cuyo valor fue de  $112.5 \pm 10.3$  ms ( $n=6$ ).



**Figura 16. Características electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$ .** A. Registro de la corriente generada por los canales  $K_v4.3$  transfectados de forma transitoria en células CHO, tras la aplicación de pulsos despolarizantes desde -80 mV a +60 mV en intervalos de 10 mV. B. Relación intensidad-voltaje (IV) de los canales  $K_v4.3$ . C. Curva de inactivación (○) y curva de activación (□) de los canales  $K_v4.3$ . D. Cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ . Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 6-21 experimentos.

#### 4.2. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP2.

Las características electrofisiológicas de las corrientes iónicas generadas por los canales  $K_v4.3$  junto con la subunidad reguladora KChIP2 se muestran en la Figura 17. El protocolo IV empleado fue el mismo que el descrito para las corrientes producidas por los canales  $K_v4.3$  transfectados aislados. De la misma manera, cuanto más positivo es el pulso aplicado mayor es la amplitud de la corriente de  $K^+$  generada (Figura 17A).



**Figura 17. Características electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$ +KChIP2.** **A.** Registro de la corriente generada por los canales  $K_v4.3$ +KChIP2 transfectados de forma estable en células CHO, tras la aplicación de pulsos despolarizantes desde  $-80$  mV a  $+60$  mV en intervalos de  $10$  mV. **B.** Relación IV de los canales  $K_v4.3$ +KChIP2. **C.** Curva de inactivación ( $\circ$ ) y curva de activación ( $\square$ ) de los canales  $K_v4.3$ +KChIP2. **D.** Cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ +KChIP2. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 10-19 experimentos.

En este caso, se trata también de una corriente de activación muy rápida. El proceso de activación se ajusta a una ecuación monoexponencial. Los valores de  $\tau_{Act}$  obtenidos fueron de  $0.9 \pm 0.05$  ms ( $n=19$ ) a  $+60$  mV y de  $5.0 \pm 0.4$  ms ( $n=19$ ) a  $0$  mV. Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los canales  $K_v4.3$  solo se observan diferencias significativas en los valores de  $\tau_{Act}$  medidos a  $+60$  mV ( $n=19$ ,  $p<0.05$ ) (Tabla 3). El tiempo requerido para que estos canales alcancen el valor máximo de la

corriente a +60 mV fue de  $4.1 \pm 0.3$  ms, que comparado con el valor de los canales  $K_{V4.3}$  no presenta diferencias significativas (Tabla3).

En cuanto al proceso de inactivación es más lento que el de los canales  $K_{V4.3}$  y se ajusta a una función monoexponencial. La constante de tiempo de inactivación ( $\tau_{inac}$ ) de los canales  $K_{V4.3}$ -KCHIP2 fue de  $61.5 \pm 3.6$  ms (n=18).

La dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $K_{V4.3}$ -KCHIP2 se estudió también mediante un protocolo de doble pulso y los valores se ajustaron a una ecuación de Boltzmann (Figura 17C). El valor medio de inactivación ( $E_h$ ) fue más electropositivo que el de los canales  $K_{V4.3}$  en ausencia de KCHIP2, alcanzando un valor medio de  $-14.5 \pm 1.4$  mV (n=10,  $p>0.05$ ). El valor de la pendiente fue de  $4.4 \pm 0.2$  mV (n=10,  $p>0.05$ ) (Tabla 4).

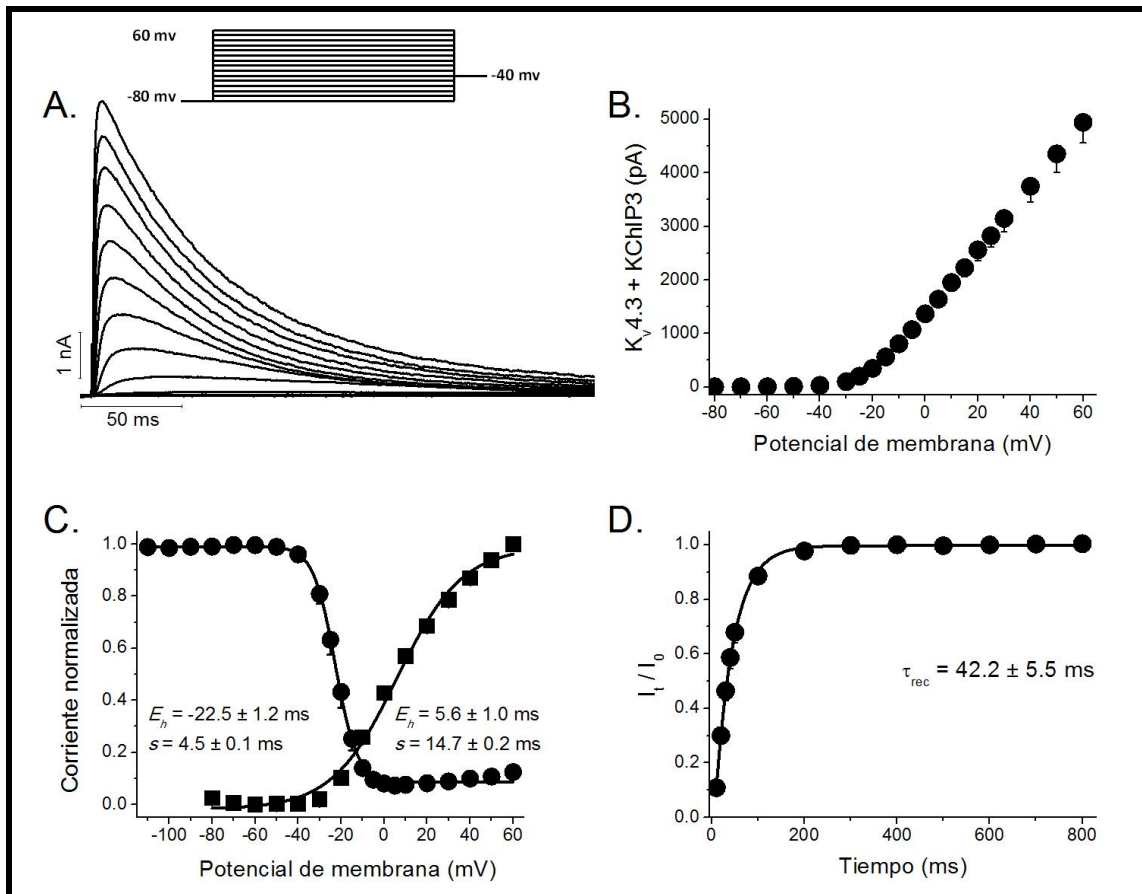
En cuanto a la curva de activación, los valores de  $E_h$  y  $s$  para los canales  $K_{V4.3}$ -KCHIP2 fueron de  $12.8 \pm 1.2$  mV y de  $13.6 \pm 0.3$  mV, respectivamente. Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los canales  $K_{V4.3}$ , no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 17C).

Para estudiar la cinética de recuperación de la inactivación en estos canales se empleó el mismo protocolo de doble pulso que el descrito en el apartado anterior para los canales  $K_{V4.3}$ . Los datos obtenidos se muestran en la Figura 17D. En este caso la  $\tau_{rec}$  tuvo un valor de  $28.7 \pm 4.0$  ms (n=10), significativamente más rápida que la obtenida para los canales  $K_{V4.3}$  ( $p<0.05$ ).

### 4.3. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LOS CANALES $K_{V4.3}$ -KCHIP3.

Las características electrofisiológicas de las corrientes de  $K^+$  que presentan los canales  $K_{V4.3}$  expresados junto con la subunidad reguladora KCHIP3 se muestran en la Figura 18. El protocolo para obtener los valores para construir la relación IV empleado fue el mismo que el descrito en los casos anteriores. Del mismo modo que en los casos anteriores, cuanto más positivo es el pulso aplicado, mayor es la amplitud de la corriente de  $K^+$  generada (Figura 18A).

La subunidad reguladora KCHIP3 acelera el proceso de activación de los canales  $K_{V4.3}$ . Los valores de  $\tau_{Act}$  medidos a +60 mV y a 0 mV fueron de  $0.9 \pm 0.02$  ms y de  $3.7 \pm 0.1$  ms, respectivamente (n=22). Estos resultados son significativamente menores que los obtenidos para los canales  $K_{V4.3}$  (Tabla 3). En cuanto al tiempo necesario para alcanzar el pico de la corriente a +60 mV fue de  $4.9 \pm 0.3$  ms, es decir, similar al de los canales  $K_{V4.3}$  y  $K_{V4.3}$ -KCHIP2. Solo se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el tiempo requerido para que la corriente alcance su valor máximo entre los canales  $K_{V4.3}$ -KCHIP2 y  $K_{V4.3}$ -KCHIP3 si lo medimos a 0 mV, en este caso parece que la subunidad reguladora KCHIP2 enlentece el proceso de activación del canal (Tabla 3).



**Figura 18. Características electrofisiológicas de los canales Kv4.3+KChIP3.** A. Registro de la corriente generada por los canales Kv4.3+KChIP3 transfectados de forma transitoria en células CHO, tras la aplicación de pulsos despolarizantes desde -80 mV a +60 mV en intervalos de 10 mV. B. Relación IV de los canales Kv4.3+KChIP3. C. Curva de inactivación (●) y curva de activación (■) de los canales Kv4.3+KChIP3. D. Cinética de recuperación de la inactivación de los canales Kv4.3+KChIP3. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 10-72 experimentos.

**Tabla 3.** Tiempo al pico (ms) y constante de tiempo de activación ( $\tau_{Act}$ ) (ms) de la corriente generada por los canales Kv4.3, Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3 tras la aplicación de pulsos despolarizantes a +60 y 0 mV.

Canal	+60 mV			0 mV		
	Kv4.3	Kv4.3-KChIP2	Kv4.3- KChIP3	Kv4.3	Kv4.3-KChIP2	Kv4.3- KChIP3
Tiempo a pico	4.5 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.3	16.6 $\pm$ 2.8	23.0 $\pm$ 1.6	18.0 $\pm$ 0.9**
$\tau_{Act}$	1.2 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.05*	0.9 $\pm$ 0.02*	6.6 $\pm$ 0.7	5.0 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.1*/**

Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 19-22 experimentos. \* $p < 0.05$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos para Kv4.3. \*\* $p < 0.05$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos para los canales Kv4.3-KChIP2.

En este caso, el proceso de inactivación es muy similar al obtenido en Kv4.3-KChIP2. La cinética de inactivación de estos canales es más lenta que la de los canales Kv4.3 y se ajusta a una función

monoexponencial con una  $\tau_{inac}$  que alcanzó un valor medio de  $79.1 \pm 2.7$  ms (n=55). Este valor resultó ser más lento que el de los canales  $K_v4.3$ -KChIP2 ( $p < 0.05$ ). (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen comparativo de los valores correspondientes a la cinética de inactivación ( $\tau_{inac,slow}$ ,  $\tau_{inac,fast}$ ,  $\tau_{inac}$ ), dependencia de voltaje de la inactivación ( $E_h$ ,  $s$ ) y recuperación de la inactivación ( $\tau_{rec}$ ) obtenidos para los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.

Canal	$\tau_{inac,slow}$ (ms)	$\tau_{inac,fast}$ (ms)	$E_h$ (mV)	$s$ (mV)	$\tau_{rec}$ (ms)
$K_v4.3$	$74.2 \pm 4.7$	$20.1 \pm 1.5$	$-29.4 \pm 1.2$	$5.0 \pm 0.2$	$112.5 \pm 10.3$
Canal	$\tau_{inac}$ (ms)		$E_h$ (mV)	$s$ (mV)	$\tau_{rec}$ (ms)
$K_v4.3$ -KChIP2	$61.5 \pm 3.6$		$-14.5 \pm 1.4$	$4.4 \pm 0.2$	$28.7 \pm 4.0^*$
$K_v4.3$ -KChIP3	$79.1 \pm 2.7^{**}$		$-22.5 \pm 1.2^{***}$	$4.5 \pm 0.1^*$	$42.1 \pm 5.5^*$

Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 6-55 experimentos. \* $p < 0.05$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos para  $K_v4.3$ . \*\* $p < 0.05$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos para los canales  $K_v4.3$ -KChIP2.

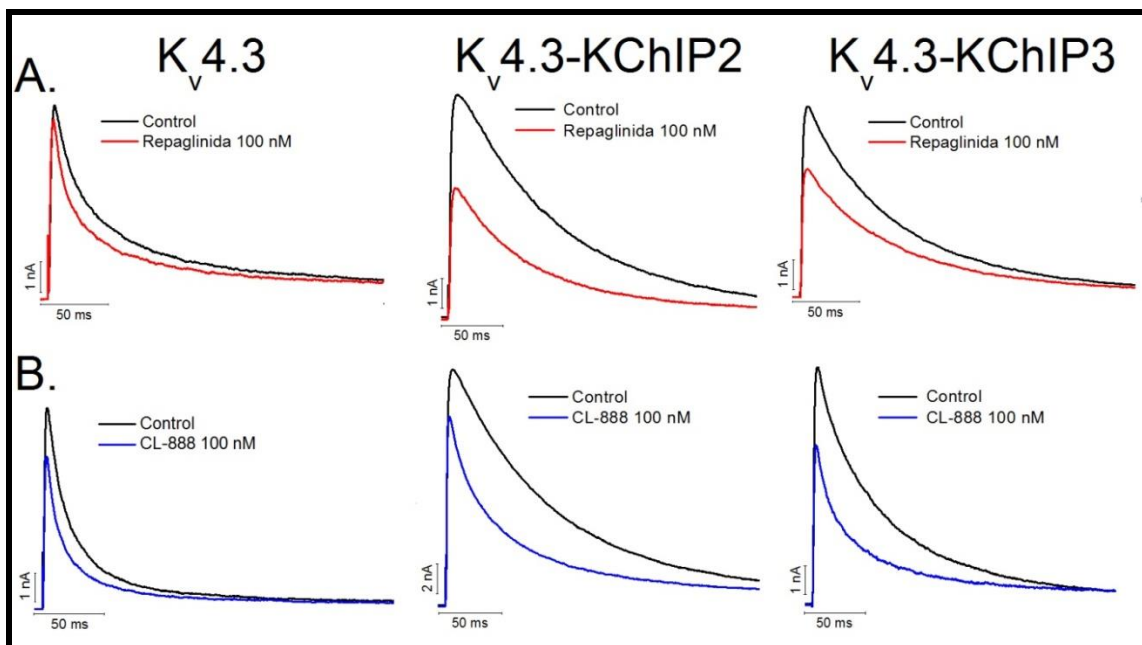
Para estudiar la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 se utilizó el mismo protocolo de doble pulso que en los casos anteriores y los valores se ajustaron a una ecuación de Boltzmann (Figura 18C). En este caso el valor de  $E_h$  obtenido fue de  $-22.5 \pm 1.2$  mV (n=11) y el de la pendiente ( $s$ ) de  $4.5 \pm 0.1$  mV (n=11).

La curva de activación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 se muestra en la Figura 18C. El valor de  $E_h$  para estos canales fue de  $5.6 \pm 1.0$  mV, es decir, significativamente menor que el obtenido para los canales  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2. (n=31,  $p < 0.05$ ). Esto implica que la subunidad reguladora KChIP3 es capaz de desplazar la curva de activación hacia potenciales más electronegativos. Por el contrario, los valores de la pendiente de la curva de activación se mantuvieron semejantes con respecto a  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2.

La cinética de recuperación de la inactivación en estos canales se estudió del mismo modo que para los canales  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ +KChIP2. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 18D y en la Tabla 4. La constante de tiempo de recuperación alcanzó un valor medio de  $42.1 \pm 5.5$  ms (n=10), que resultó ser significativamente más rápida que la obtenida para los canales  $K_v4.3$  ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. SELECTIVIDAD DE REPAGLINIDA Y CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 Y $K_v4.3$ -KChIP3.

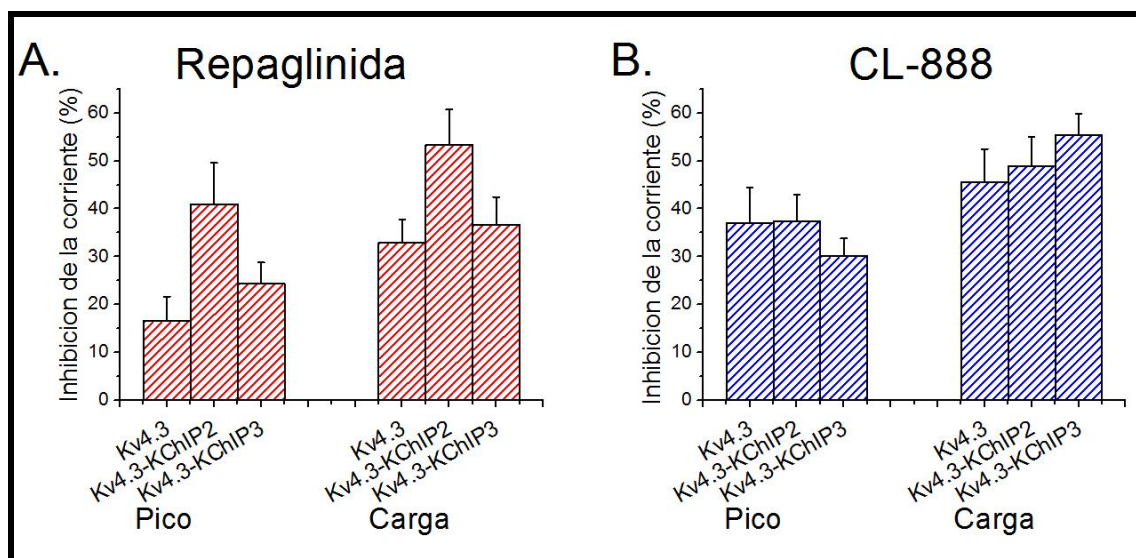
Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue estudiar los efectos de la Repaglinida y del CL-888 sobre la inhibición de las corrientes de potasio  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 con el fin de determinar la posible selectividad de los mismos sobre KChIP3. Para ello, comparamos el porcentaje de bloqueo que producen ambos compuestos sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. En todos los grupos experimentales el grado de inhibición de la corriente se estimó tanto como una disminución de la magnitud de la corriente medida en el pico máximo, así como una disminución de la carga eléctrica que atraviesa la membrana durante la aplicación del pulso despolarizante, ya que esta medida tiene en cuenta los posibles efectos que estos compuestos puedan producir sobre la cinética de inactivación de la corriente modulada por KChIP2 y KChIP3.



**Figura 19.** Registros de corriente en los que se muestran los efectos de Repaglinida y CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. **A.** Comparación de los efectos de Repaglinida 100 nM sobre las corrientes generadas por  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. **B.** Comparación de los efectos de CL-888 100 nM sobre las corrientes generadas por  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.

La Figura 19A muestra que la Repaglinida tiene un mayor efecto inhibitorio sobre las corrientes producidas por  $K_v4.3$ -KChIP2 que sobre los canales  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP3 ( $53.3 \pm 7.3$  % vs  $36.7 \pm 5.3$  % y  $36.6 \pm 5.8$  %;  $p > 0.05$ ,  $n = 3-6$ ). Además, el porcentaje de bloqueo siempre resultó ser mayor cuando se medía sobre el grado de disminución de la carga que sobre el grado de inhibición del pico máximo de la corriente (Figura 20A). Por tanto, la Repaglinida tiene mayores efectos bloqueantes del canal  $K_v4.3$  en presencia de la subunidad reguladora KChIP2.

Los efectos del CL-888 sobre la inhibición de la corriente producida por los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 se muestran en la Figura 19B. En este caso, las diferencias en el porcentaje de bloqueo entre las corrientes estudiadas no resultaron ser significativas. Cuando medimos los efectos del CL-888 como disminución del pico de la corriente se aprecia el efecto menor sobre los canales  $K_v4.3$ -KChIP3. Sin embargo, si medimos el bloqueo como la disminución en la carga eléctrica, el CL-888 presenta mayor efecto inhibitorio sobre la corriente  $K_v4.3$ -KChIP3, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas comparado con el bloqueo sobre  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 ( $55.4 \pm 4.3\%$  vs.  $45.6 \pm 6.8\%$  y  $48.9 \pm 6.1\%$ ,  $p > 0.05$ ,  $n = 3-8$ ) (Figura 20B).



**Figura 20. Efectos de Repaglinida y CL-888 sobre la inhibición de la corriente generada por los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.** **A.** Porcentaje de inhibición de las corrientes de  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 producido por Repaglinida 100 nM. El tanto por ciento de bloqueo se estimó tanto como una disminución de la magnitud del pico máximo de la corriente como la disminución de la carga eléctrica que pasaba a través de la membrana. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 3-6 experimentos. **B.** Porcentaje de inhibición de las corrientes de  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 producido por CL-888 100 nM. El porcentaje de bloqueo se midió tanto como una disminución de la magnitud del pico máximo de la corriente como la disminución de la carga eléctrica que pasaba a través de la membrana. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 3-8 experimentos.

Cuando comparamos los efectos de ambos compuestos sobre la inhibición de las 3 corrientes a la misma concentración, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el bloqueo producido por Repaglinida y por CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$  ni sobre  $K_v4.3$ -KChIP2. Tan sólo se observan diferencias en  $K_v4.3$ -KChIP3, donde la Repaglinida es más potente que el CL-888 (Tabla 5). Por tanto, las dos moléculas de estudio presentan una selectividad similar por los canales  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2.

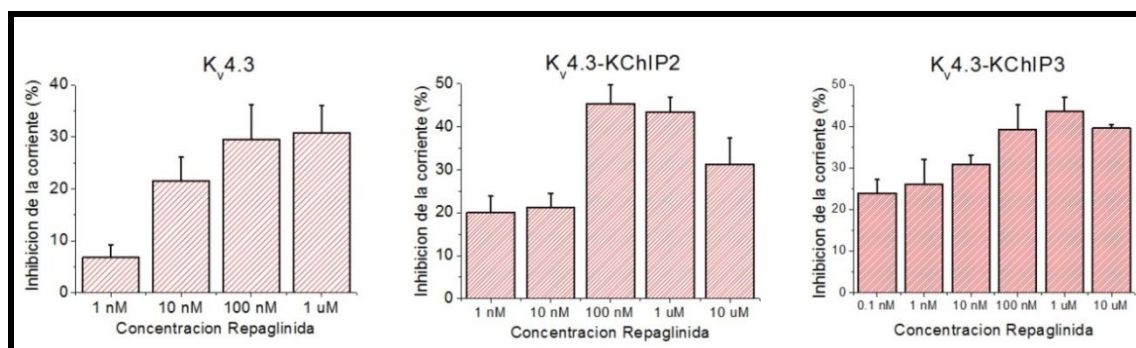


**Tabla 5.** Comparación del porcentaje de bloqueo producido por Repaglinida y CL-888 (100 nM) sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.

Canal	Repaglinida (%)	CL-888 (%)
$K_v4.3$	$45.6 \pm 6.8$	$36.9 \pm 5.3$
$K_v4.3$ -KChIP2	$48.89 \pm 6.1$	$53.3 \pm 7.3$
$K_v4.3$ -KChIP3	$55.5 \pm 4.3^*$	$36.6 \pm 5.8$

El bloqueo se estimó como la disminución de la carga eléctrica. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. de 3-8 experimentos. \* $p < 0.05$ , diferencias estadísticamente significativas comparado con CL-888.

Para estudiar la dependencia de concentración de ambos fármacos se ensayaron distintas concentraciones de los mismos sobre cada corriente ( $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3). En todos los casos el porcentaje de bloqueo se midió como la disminución de la carga que pasa a través de la membrana celular, estimada a partir de la integral del trazo de corriente. Los datos obtenidos para cada concentración de fármaco ensayada se ajustaron a una ecuación de Hill:  $(1 / [1 + (CI_{50} / [F]^{nH})])$ . De esta forma, se obtuvo el valor de la concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) correspondiente a cada canal de estudio. La  $CI_{50}$  es la concentración de fármaco a la cual el 50% de los canales son bloqueados por el mismo.

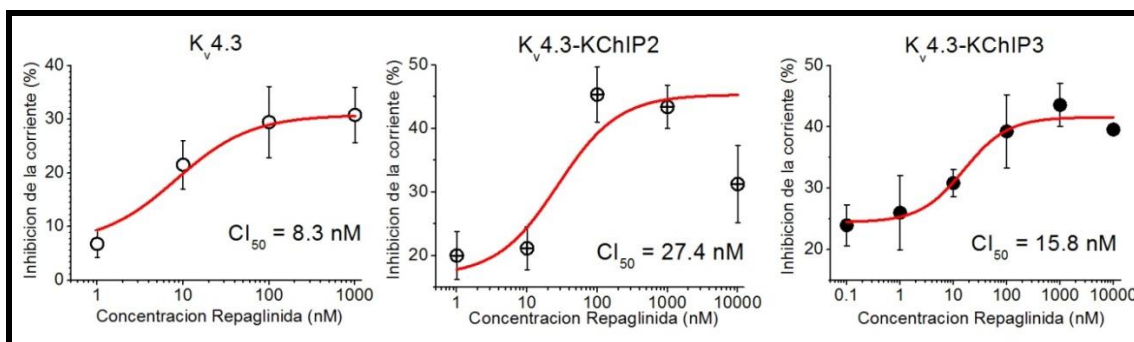


**Figura 21.** Dependencia de concentración del bloqueo producido por Repaglinida en los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Se representa el porcentaje de inhibición de la corriente producido por distintas concentraciones de Repaglinida. El bloqueo se midió como la disminución de la carga eléctrica que pasa a través de la membrana celular. Cada dato representa la media  $\pm$  E.E.M. de 3-11 experimentos.

La Figura 21 muestra la dependencia de concentración del bloqueo producido por Repaglinida sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Para los tres canales de estudio se observa que en ningún caso el bloqueo producido por Repaglinida alcanza el 100% de la corriente ni tampoco llega al 0% de inhibición de la misma. Es decir, en todos los casos existe un bloqueo basal mínimo que oscila entre el  $6.8 \pm 2.5\%$  ( $n=6$ ) para  $K_v4.3$  y el  $20.0 \pm 3.8\%$  para  $K_v4.3$ -KChIP2 ( $n=6$ ). En todos los casos, el porcentaje de bloqueo aumenta conforme incrementamos la concentración de fármaco hasta que alcanza un valor máximo de bloqueo a partir del cual el efecto del fármaco disminuye. Además, en ningún caso la

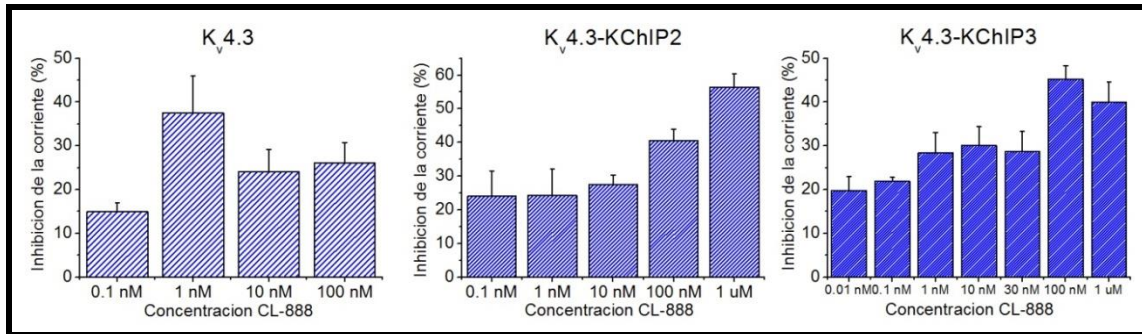
diferencia entre el bloqueo basal y el máximo supera el 25%. Para todos los grupos experimentales, el bloqueo por Repaglinida es dependiente de concentración. Cabe destacar que el efecto de la Repaglinida siempre fue menor sobre los canales  $K_v4.3$  solos que en presencia de subunidades reguladoras.

La mayor efectividad del fármaco se observa sobre los canales  $K_v4.3$  cuyo valor de  $CI_{50}$  fue de 8.3 nM, es decir, menor que los obtenidos para  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Sin embargo, el efecto máximo tan sólo alcanza el 30% de inhibición de la corriente, mientras que en presencia de KChIP2 y KChIP3 alcanza valores de 45%. Más aún, a concentraciones entre 1-10 nM en el caso de canales  $K_v4.3$ -KChIP2 y 0.1-1 nM en el caso de  $K_v4.3$ -KChIP3 Repaglinida produce una inhibición basal del 20%. (Figuras 21 y 22).



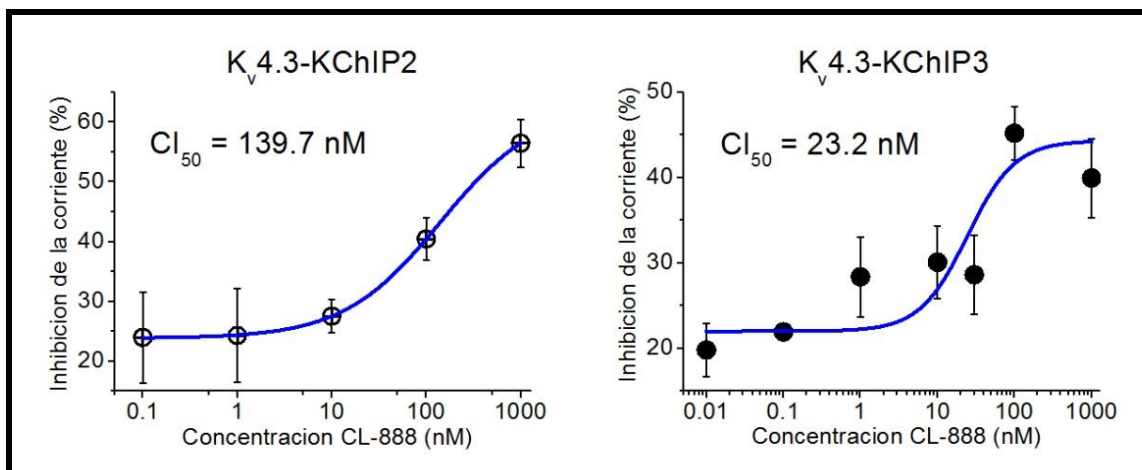
**Figura 22. Curvas dosis-respuesta de Repaglinida en los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.** La línea representa el ajuste de los datos a una ecuación de Hill. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  E.E.M. de los experimentos realizados para cada concentración (n= 3-11 experimentos).

En cuanto al CL-888, también se observa una dependencia de concentración del bloqueo que produce sobre los canales  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 (Figura 23). Al igual que ocurre en el caso de la Repaglinida, existe en los tres canales de estudio un bloqueo basal que en este caso supone el  $14.9 \pm 2.0$  % para  $K_v4.3$  (n=3),  $23.9 \pm 7.6$  % para  $K_v4.3$ -KChIP2 (n=3) y el  $19.8 \pm 3.1$  % para  $K_v4.3$ -KChIP3 (n=7). En ningún caso se consigue el 100% de inhibición de la corriente. La diferencia entre el bloqueo basal y el máximo en el caso del CL-888 nunca supera el 32%. Podemos observar que en este caso el bloqueo producido por el compuesto también aumenta conforme se incrementa la concentración de fármaco ensayada, hasta alcanzar la concentración a partir de la cual el efecto del fármaco disminuye.



**Figura 23. Dependencia de concentración del bloqueo producido por CL-888 en los canales Kv4.3, Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3.** Se representa el porcentaje de inhibición de la corriente producido por distintas concentraciones de CL-888. El bloqueo se midió como la disminución de la carga eléctrica que pasa a través de la membrana celular. Cada dato representa la media  $\pm$  E.E.M. de 3-8 experimentos para cada concentración.

En el caso del CL-888, la mayor efectividad del compuesto se observa sobre los canales Kv4.3-KChIP3 cuyo valor de  $CI_{50}$  fue de 23.2 nM; menor que los obtenidos para Kv4.3 y Kv4.3-KChIP2 (Figura 24). De forma similar a lo observado con Repaglinida, el efectos inhibitorio máximo producido en canales Kv4.3 resultó ser menor que el observado en las corrientes generadas por Kv4.3 en presencia de KChIP2 y KChIP3 (35% frente a 55% y 45%, respectivamente). Además, a concentraciones entre 0.1-10 nM en el caso de canales Kv4.3-KChIP2 y 0.01-0.1 nM en el caso de Kv4.3-KChIP3, CL-888 produce una inhibición basal del 20%; mientras que el bloqueo basal producido por CL-888 en Kv4.3 fue de 14% (Figuras 23 y 24).

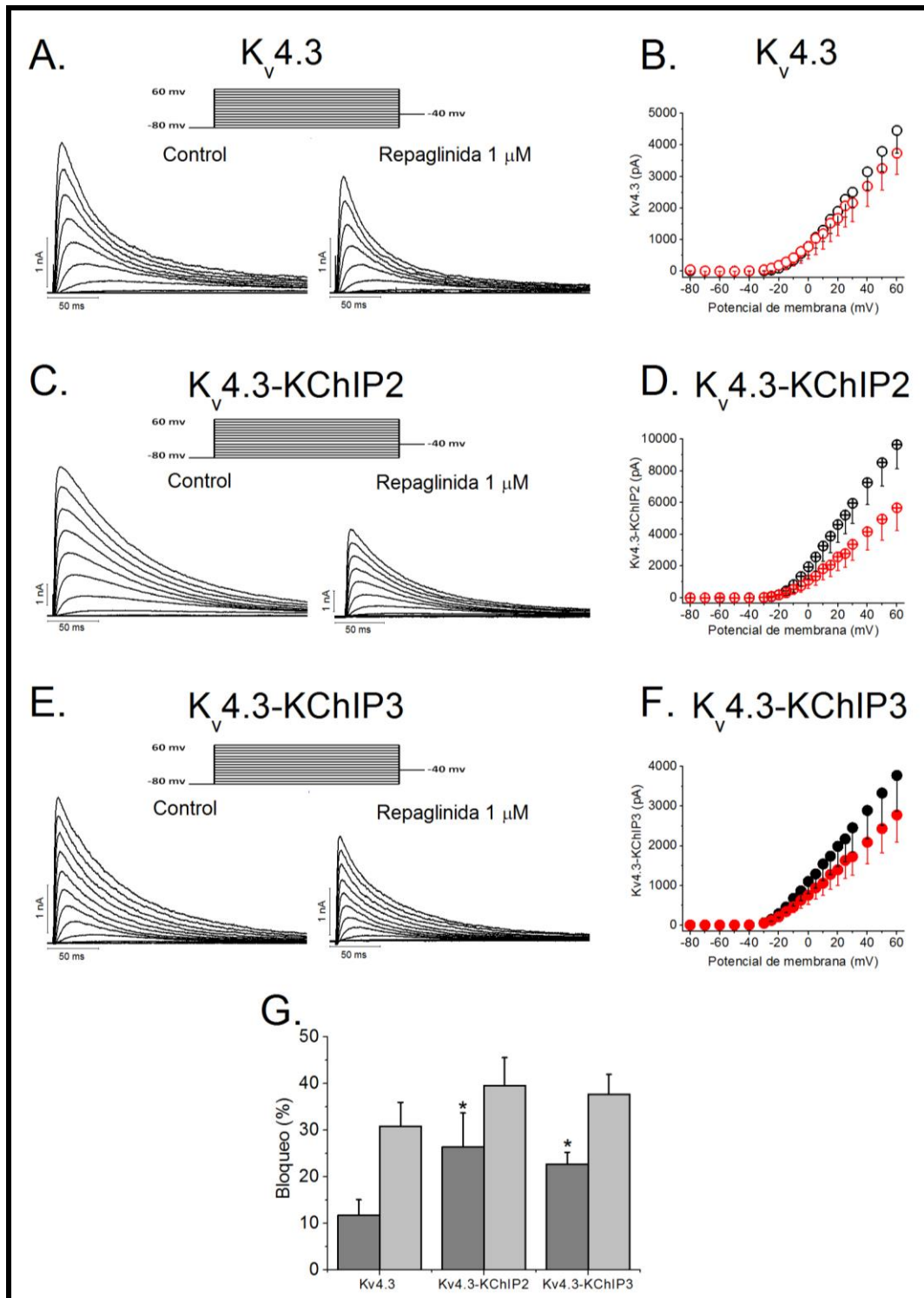


**Figura 24. Curvas dosis-respuesta de CL-888 en los canales Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3.** La línea representa el ajuste de los datos a una ecuación de Hill. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  E.E.M. de los experimentos realizados para cada concentración (n= 3-8 experimentos).

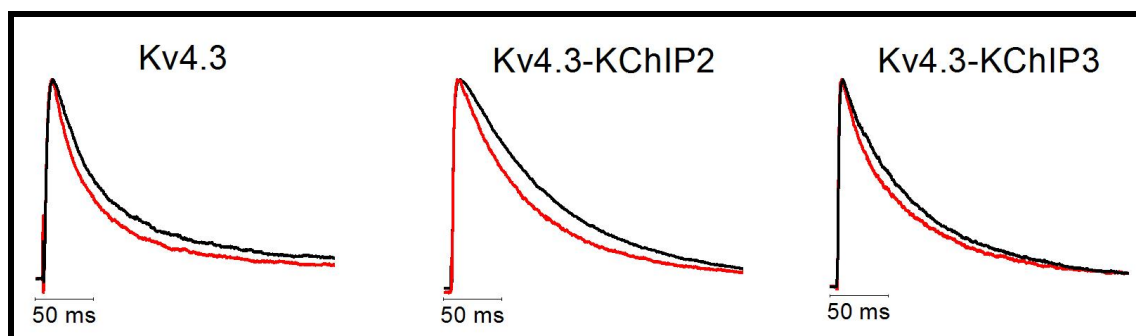
### 4.5. EFECTOS DE REPAGLINIDA SOBRE LOS CANALES $K_{V4.3}$ , $K_{V4.3}$ -KChIP2 Y $K_{V4.3}$ -KChIP3.

Para analizar los efectos de la Repaglinida sobre los canales  $K_{V4.3}$ ,  $K_{V4.3}$ -KChIP2 y  $K_{V4.3}$ -KChIP3 se utilizó el protocolo de IV descrito anteriormente, obteniendo los registros que se muestran en la Figura 25 (A, C y E). En esta figura se muestran registros obtenidos tanto en situación control como en presencia de Repaglinida 1  $\mu$ M. Los paneles de la derecha (B, D y F) muestran la relación IV en ausencia y en presencia de Repaglinida (1  $\mu$ M) para cada situación experimental. La Figura 25G muestra el porcentaje de bloqueo producido por Repaglinida (1  $\mu$ M) sobre las corrientes  $K_{V4.3}$ ,  $K_{V4.3}$ -KChIP2 y  $K_{V4.3}$ -KChIP3, medido como disminución en la amplitud del pico máximo de la corriente y como disminución de la carga eléctrica que atraviesa la membrana. Si tomamos como referencia la disminución en el pico máximo de la corriente, el mayor porcentaje de bloqueo se obtuvo en  $K_{V4.3}$ -KChIP2 ( $26.4 \pm 7.0$  %;  $n=4$ ) mientras que el efecto menor se produjo sobre  $K_{V4.3}$  ( $11.7 \pm 3.4$  %;  $n=5$ ;  $p<0.05$ ). El bloqueo producido por Repaglinida en canales  $K_{V4.3}$ -KChIP3 también fue mayor que el observado en  $K_{V4.3}$  ( $22.7 \pm 2.5$  % vs.  $11.7 \pm 3.4$  %;  $n=10$ ,  $p<0.05$ ). Sin embargo, si comparamos el bloqueo producido por Repaglinida como la disminución de la carga, no se aprecian diferencias significativas entre los distintos canales de estudio (Figura 25G). Cabe destacar que el porcentaje de bloqueo medido como disminución de la carga eléctrica siempre fue mayor que el bloqueo al pico, siendo este aumento significativamente mayor para todos los canales de estudio ( $p<0.05$ ).

Uno de los efectos más llamativos que produce el fármaco es la aceleración del proceso de inactivación de la corriente de  $K_{V4.3}$ ,  $K_{V4.3}$ -KChIP2 y  $K_{V4.3}$ -KChIP3 (Figura 26). En el caso de  $K_{V4.3}$  la inactivación es un proceso biexponencial y la Repaglinida disminuyó la constante de tiempo de inactivación rápida ( $\tau_{inac,fast}$ ) desde  $17.9 \pm 3.0$  ms en situación control a  $10.7 \pm 1.5$  ms ( $n=4$ ;  $p>0.05$ ). Las corrientes  $K_{V4.3}$ -KChIP2 y  $K_{V4.3}$ -KChIP3 presentan una inactivación más lenta que se ajusta a una función monoexponencial. En ambos casos, la Repaglinida convierte la inactivación en un proceso biexponencial, añadiendo un componente de inactivación rápida y, por tanto, acelerando el proceso. Para  $K_{V4.3}$ -KChIP2 la constante de tiempo de inactivación ( $\tau_{inac}$ ) pasó de  $58.6 \pm 8.1$  ms a  $54.0 \pm 10.0$  ms ( $\tau_{inac,slow}$ ) en ausencia y en presencia de Repaglinida ( $n=4$ ;  $p>0.05$ ). En el caso de  $K_{V4.3}$ -KChIP3, los valores de la  $\tau_{inac}$  y de la  $\tau_{inac,slow}$  (en presencia de Repaglinida) fueron de  $90.0 \pm 11.0$  ms y de  $84.2 \pm 8.3$  ms, respectivamente ( $n=9$ ;  $p>0.05$ ).



**Figura 25. Dependencia de voltaje del bloqueo inducido por Repaglinida sobre los canales  $K_{V4.3}$ ,  $K_{V4.3}$ -KChIP2 y  $K_{V4.3}$ -KChIP3. A, C y E.** Trazos originales producidos por  $K_{V4.3}$  (A),  $K_{V4.3}$ -KChIP2 (C) y  $K_{V4.3}$ -KChIP3 (E) en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de Repaglinida 1  $\mu$ M, tras la aplicación del protocolo que se representa en la parte superior de la figura. **B, D y F.** Relación IV de la corriente  $K_{V4.3}$  (B),  $K_{V4.3}$ -KChIP2 (D) y  $K_{V4.3}$ -KChIP3 (F) generada en presencia (rojo) y en ausencia (negro) de Repaglinida 1  $\mu$ M. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 4-10 experimentos. **G.** Diagrama de barras representando el porcentaje de bloqueo inducido por Repaglinida 1  $\mu$ M sobre  $K_{V4.3}$ ,  $K_{V4.3}$ -KChIP2 y  $K_{V4.3}$ -KChIP3, medido como disminución en el pico máximo de la corriente (gris oscuro) y como disminución de la carga (gris claro). \*  $p < 0.05$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a los canales  $K_{V4.3}$ .



**Figura 26. Efectos de Repaglinida sobre la aceleración de la inactivación de las corrientes generadas por Kv4.3, Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3.** Se representan los trazos normalizados para mostrar las diferencias en las cinéticas de inactivación en ausencia (trazo negro) y presencia (trazo rojo) de Repaglinida 1  $\mu$ M, tras aplicar pulsos despolarizantes de 250 ms de duración desde -80 mV a +60 mV.

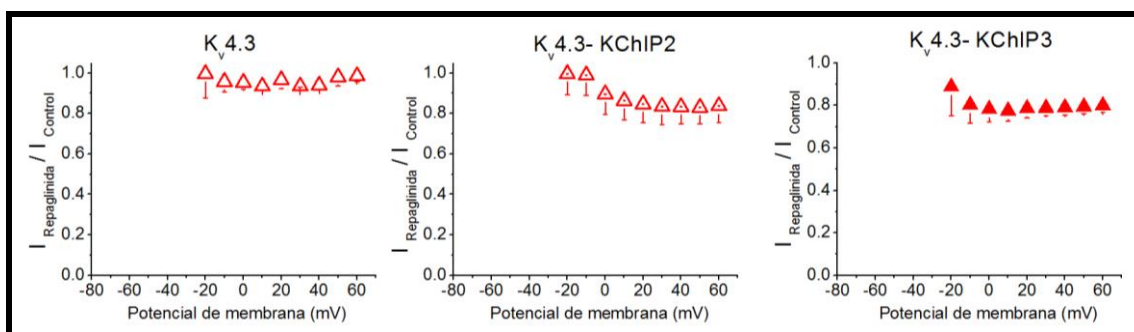
Los efectos inhibitorios de la Repaglinida sobre las corrientes generadas por los canales Kv4.3, Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3 no sólo se midieron como la disminución en la amplitud del pico máximo de la corriente sino como la disminución de la carga eléctrica que atraviesa la membrana celular. Esto se debe a que el fármaco acelera la inactivación por lo que la medida del bloqueo en el pico máximo sólo reflejaría el bloqueo de los canales cerrados y abiertos, pero no tendría en cuenta sus posibles efectos sobre el estado inactivo de los mismos. En todas las situaciones experimentales, la Repaglinida presenta un mayor porcentaje de bloqueo medido como disminución de la carga que como disminución del pico de la corriente (Tabla 6).

**Tabla 6. Grado de bloqueo de los canales Kv4.3, Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3 inducido por Repaglinida 1  $\mu$ M medido en el pico máximo de la corriente a +60 mV y como disminución de la carga a través de la membrana a +60 mV.**

Canal	Pico	Área
Kv4.3	11.7 $\pm$ 3.4	30.9 $\pm$ 5.2*
Kv4.3-KChIP2	26.4 $\pm$ 7.3	39.6 $\pm$ 6.0*
Kv4.3-KChIP3	22.7 $\pm$ 2.5	37.7 $\pm$ 4.3*

Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 4-10 experimentos. \*  $p < 0.05$ , diferencias estadísticamente significativas comparado con el bloqueo medido en el pico máximo de la corriente.

Con el fin de analizar la posible dependencia de voltaje del bloqueo inducido por Repaglinida se representó la  $I_{\text{Repaglinida}}/I_{\text{Control}}$  frente al potencial de membrana (Figura 27). En todos los casos el bloqueo aumentaba en el rango de potenciales correspondientes a los de apertura de los canales. A potenciales positivos a 0 mV, el grado de bloqueo se mantuvo constante para los canales Kv4.3, mientras que aumentó en el caso de Kv4.3-KChIP2 y Kv4.3-KChIP3.



**Figura 27. Corriente relativa para Repaglinida en los canales K<sub>v</sub>4.3, K<sub>v</sub>4.3-KChIP2 y K<sub>v</sub>4.3-KChIP3.** Para cada caso, la corriente relativa se representa como  $I_{\text{Repaglinide}} / I_{\text{Control}}$  frente al potencial de membrana, en presencia de Repaglinida 1  $\mu\text{M}$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 4-11 experimentos.

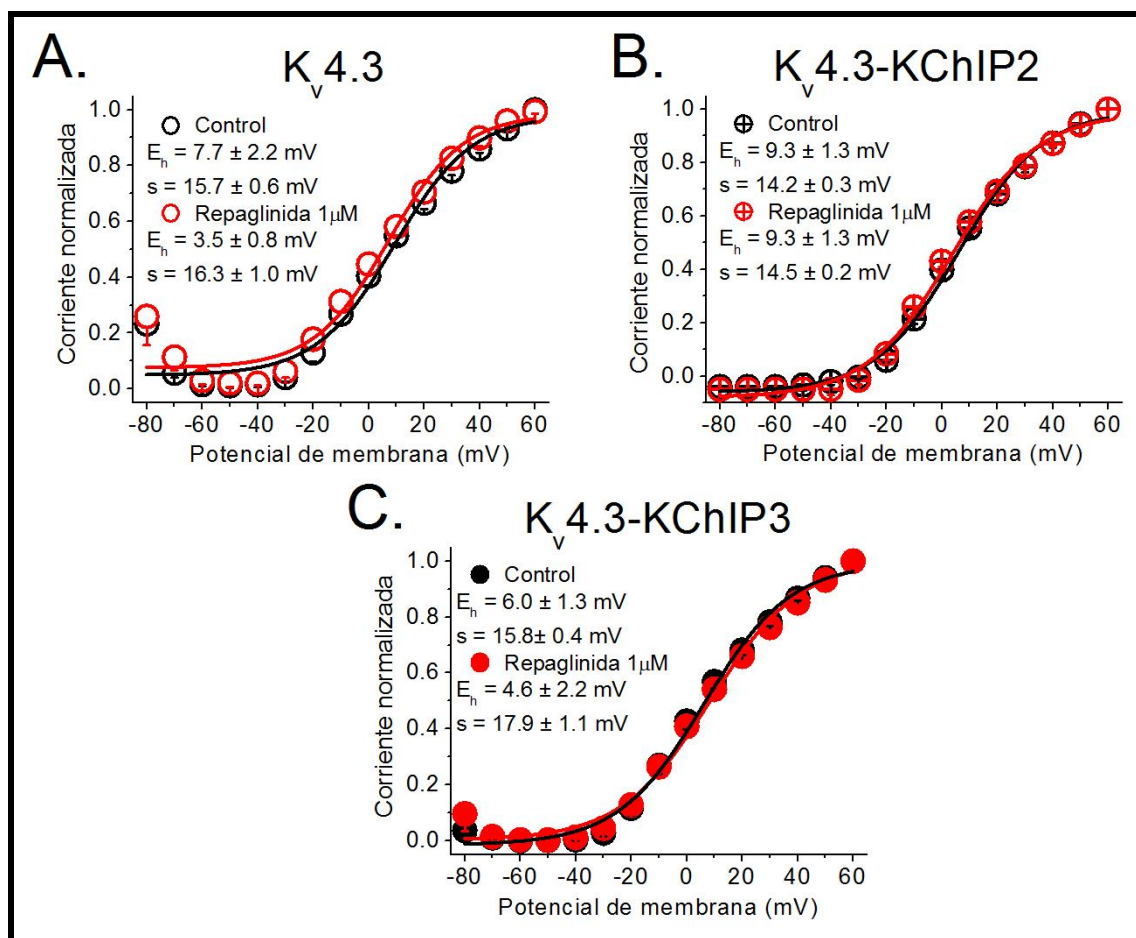
#### 4.5.1. Efectos de Repaglinida sobre la cinética de activación de los canales K<sub>v</sub>4.3, K<sub>v</sub>4.3-KChIP2 y K<sub>v</sub>4.3-KChIP3.

En la Figura 28 se muestran las curvas de activación de los canales K<sub>v</sub>4.3, K<sub>v</sub>4.3-KChIP2 y K<sub>v</sub>4.3-KChIP3 obtenidas en ausencia y presencia de Repaglinida 1  $\mu\text{M}$ . La Repaglinida no tuvo efectos sobre la curva de activación ni sobre la cinética de activación de los canales K<sub>v</sub>4.3, K<sub>v</sub>4.3-KChIP2 y K<sub>v</sub>4.3-KChIP3 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Tiempo al pico (ms) y constante de tiempo de activación ( $\tau_{\text{Act}}$ ) (ms) de la corriente generada por los canales K<sub>v</sub>4.3, K<sub>v</sub>4.3-KChIP2 y K<sub>v</sub>4.3-KChIP3 tras la aplicación de pulsos despolarizantes a +60 en ausencia y presencia de Repaglinida 1  $\mu\text{M}$ .

Canal	Control			Repaglinida		
	K <sub>v</sub> 4.3	K <sub>v</sub> 4.3-KChIP2	K <sub>v</sub> 4.3- KChIP3	K <sub>v</sub> 4.3	K <sub>v</sub> 4.3-KChIP2	K <sub>v</sub> 4.3- KChIP3
Tiempo al pico	3.2 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.6
$\tau_{\text{Act}}$	0.96 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.08	0.71 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.10

Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 4-11 experimentos.

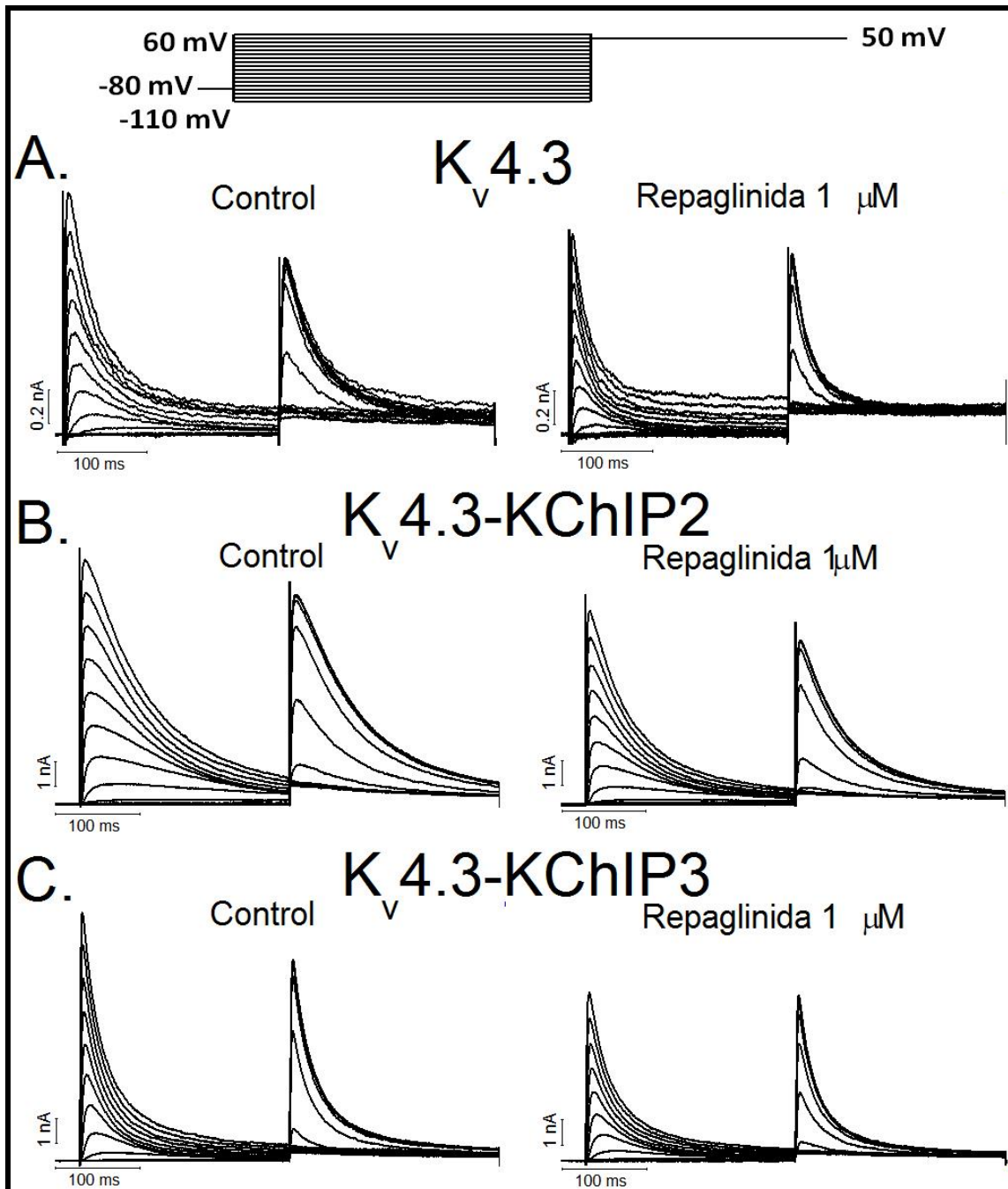


**Figura 28.** Curvas de activación de los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) obtenidas en ausencia (negro) y presencia (rojo) de Repaglinida  $1\ \mu\text{M}$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M de 4-11 experimentos.

#### 4.5.2. Efectos de Repaglinida sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3.

En la Figura 29 se muestran los registros originales de las corrientes generadas por  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) en ausencia y en presencia de Repaglinida  $1\ \mu\text{M}$ . Tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura y analizar los datos obtenidos, obtuvimos las curvas de inactivación de las corrientes respectivas en ausencia y presencia de fármaco (Figura 30).



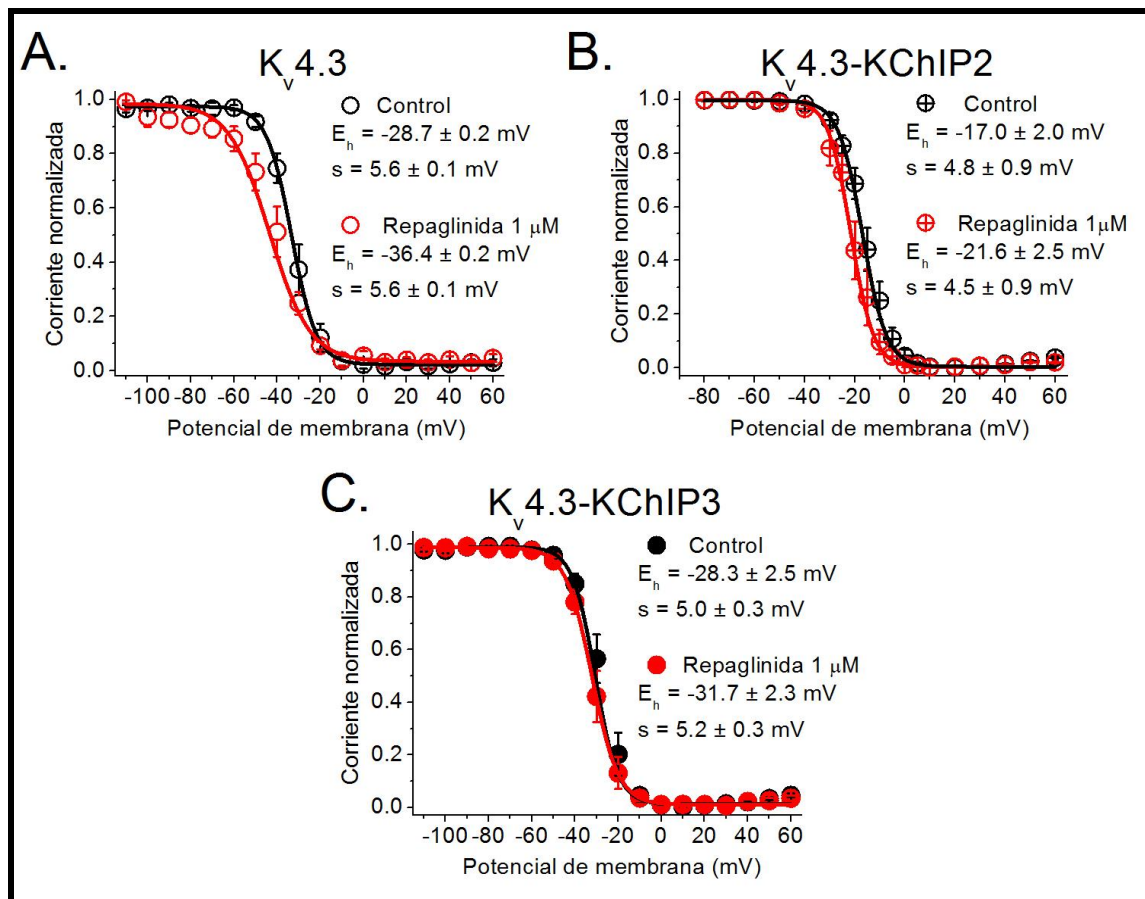


**Figura 29.** Efectos de Repaglinida sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Trazos originales de las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) en ausencia y presencia de Repaglinida  $1\mu\text{M}$ , tras la aplicación del protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura.

En el caso de  $K_v4.3$ , la Repaglinida no tuvo efectos significativos sobre la curva de inactivación, pasando el valor de  $E_h$  de  $-28.7 \pm 0.2$  mV en situación control a  $-36.4 \pm 0.2$  mV con fármaco ( $n=7$ ;  $p>0.05$ ). Los valores de la pendiente de la curva de inactivación tampoco se modificaron ( $5.6 \pm 0.1$  mV en control vs.  $5.6 \pm 0.1$  mV en presencia de Repaglinida) ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ) (Figura 30A).

En  $K_v4.3$ -KChIP2 la Repaglinida desplazó la curva de inactivación, modificando los valores de  $E_h$  hacia potenciales más electronegativos que los obtenidos en situación control. De esta forma, mientras que en ausencia de fármaco el punto medio de inactivación fue de  $-17.0 \pm 2.0$  mV y la pendiente de  $4.8 \pm 0.9$  mV, en presencia de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$  estos valores fueron de  $-21.6 \pm 2.5$  mV ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ) y  $4.5 \pm 0.9$  mV ( $n=4$ ,  $p>0.05$ ) respectivamente (Figura 30B).

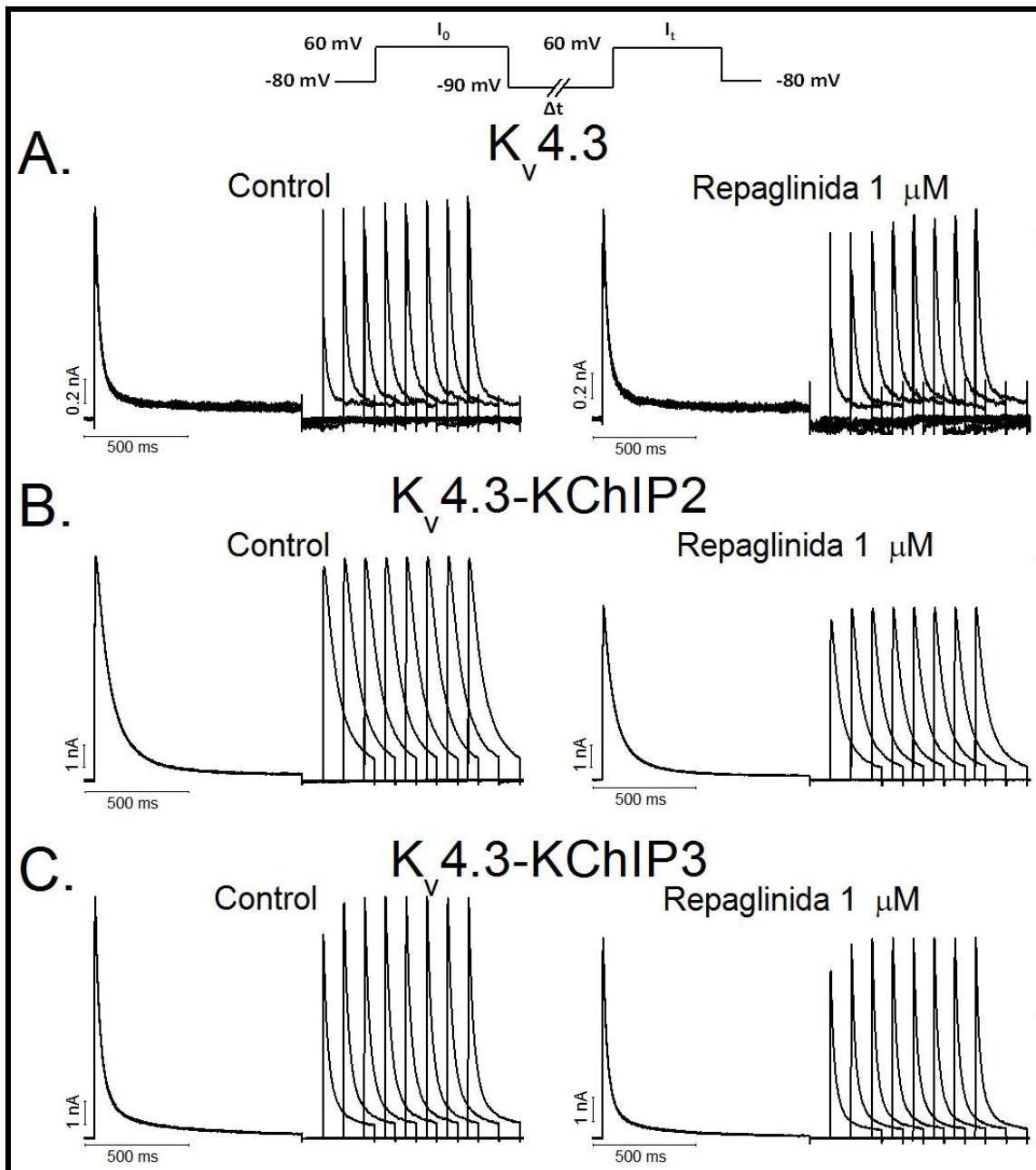
Los efectos de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$  sobre los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 fueron equivalentes a los obtenidos en los otros canales de estudio. La Repaglinida desplazó de forma estadísticamente significativa la curva de inactivación hacia potenciales más electronegativos (de  $-28.3 \pm 2.5$  mV en situación control a  $-31.7 \pm 2.3$  mV en presencia de fármaco) ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ). La pendiente de la curva de inactivación no presentó alteraciones importantes, pasando de  $5.0 \pm 0.3$  mV en ausencia de fármaco a  $5.2 \pm 0.3$  mV ( $n=6$ ;  $p>0.05$ ) en presencia del mismo (Figura 30C).



**Figura 30.** Curvas de inactivación de los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) obtenidas en ausencia (negro) y presencia (rojo) de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M de 4-7 experimentos.

#### 4.5.3. Efectos de Repaglinida sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3.

Para estudiar la cinética de recuperación de la inactivación se utilizó el protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la Figura 31. En esta misma figura se muestran las corrientes obtenidas en cada uno de los canales de estudio. Los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación monoexponencial, obteniendo los valores de la constante de tiempo de recuperación en ausencia y en presencia de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$  en los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 (Figura 32).



**Figura 31. Efectos de Repaglinida sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.** Trazos originales de las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) en ausencia y presencia de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$ , tras la aplicación del protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura.

En las corrientes generadas por  $K_v4.3$ , la Repaglinida no modificó significativamente la cinética de recuperación de la inactivación. Los valores de  $\tau_{rec}$  fueron de  $135.5 \pm 15.3$  ms en ausencia de fármaco y de  $170.5 \pm 25.0$  ms ( $n=4$ ,  $p>0.05$ ) en presencia del mismo (Figura 32A).

En el caso de los canales  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3, la Repaglinida también hizo ligeramente más lenta la recuperación de la inactivación, pero sus efectos tampoco fueron estadísticamente significativos. Los valores de  $\tau_{rec}$  fueron de  $32.2 \pm 4.4$  ms en control y de  $43.9 \pm 5.8$  ms ( $n=3$ ,  $p>0.05$ ) en presencia de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$  para  $K_v4.3$ -KChIP2 (Figura 32B); y de  $57.8 \pm 5.4$  ms en control frente a  $76.8 \pm 9.6$  ms ( $n=6$ ,  $p>0.05$ ) en presencia de fármaco para  $K_v4.3$ -KChIP3 (Figura 32C).

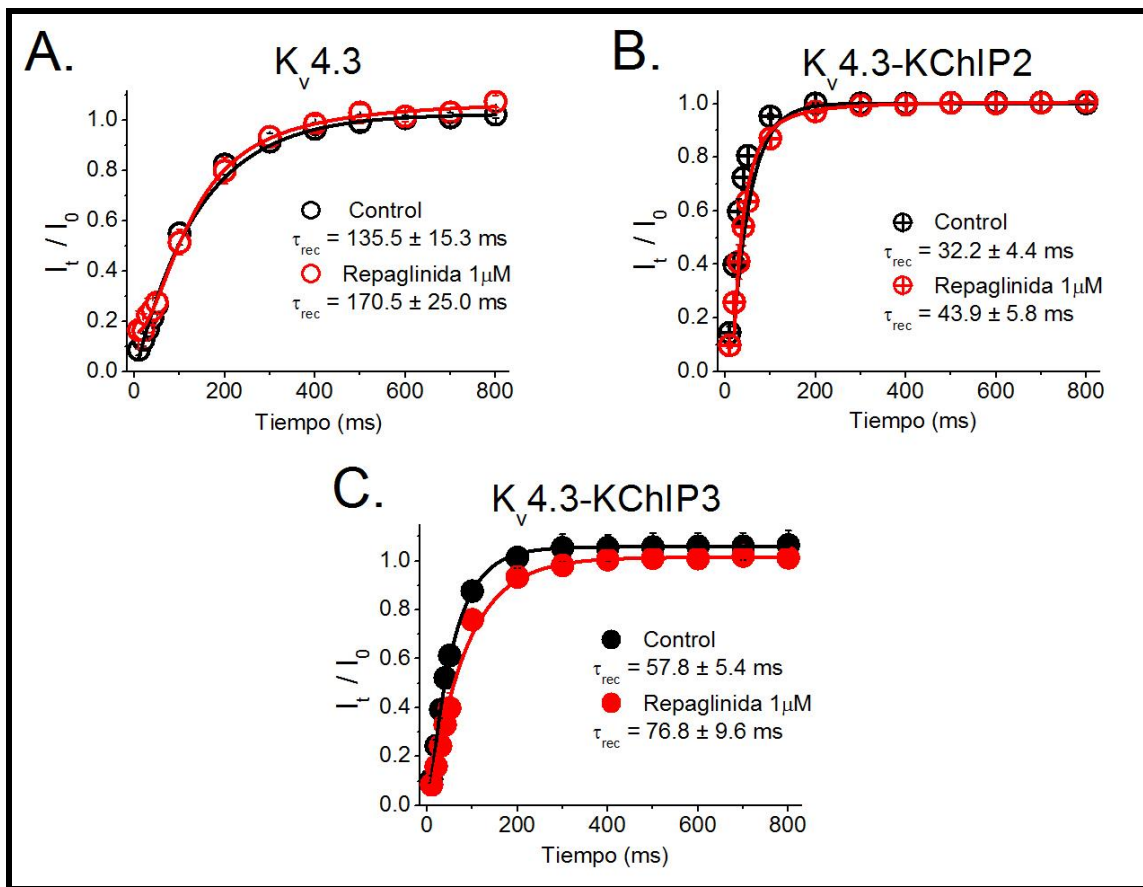


Figura 32. Cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) obtenidas en ausencia (negro) y presencia (rojo) de Repaglinida  $1 \mu\text{M}$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M de 4-7 experimentos.

#### 4.6. EFECTOS DE CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 Y $K_v4.3$ -KChIP3.

El estudio de los efectos que produce el CL-888 sobre las corrientes generadas por  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 incluye la realización del mismo protocolo de IV utilizado en los experimentos anteriores. Así, se obtuvieron registros de las corrientes correspondientes a cada canal en situación control y en presencia de CL-888  $100$  nM (Figura 33A, C y E). Las relaciones IV respectivas se muestran en los paneles de la derecha de la figura (B, D y F). El efecto inhibitorio del compuesto CL-888, medido como disminución en la magnitud del pico máximo de la corriente así como la disminución de la carga que

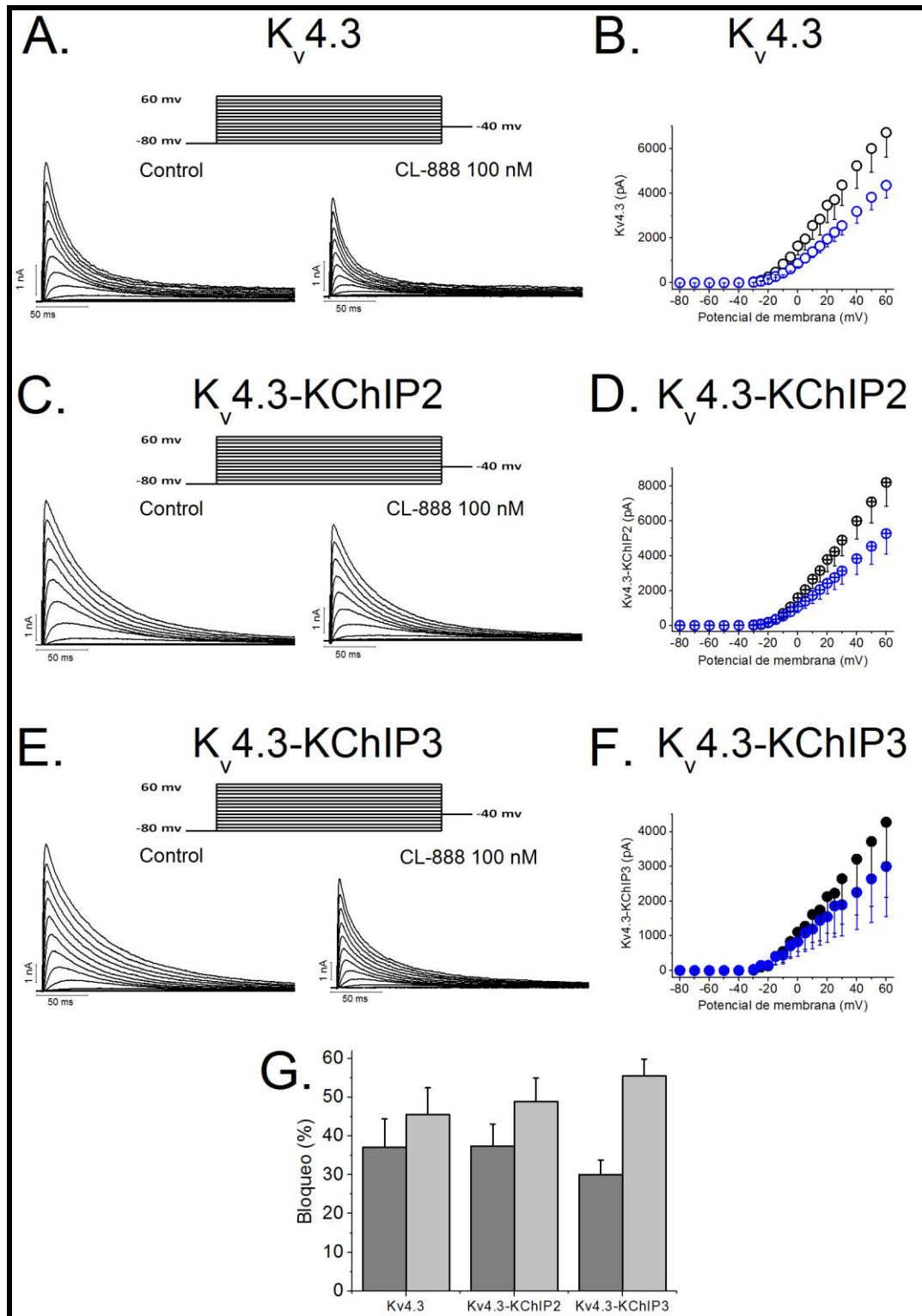
atraviesa la membrana durante la aplicación del pulso despolarizante sobre las corrientes  $K_{v4.3}$ ,  $K_{v4.3}$ -KChIP2 y  $K_{v4.3}$ -KChIP3 se muestra en la Figura 33G. En este caso el mayor porcentaje de bloqueo al pico se obtuvo en los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2 ( $37.4 \pm 5.6$  %;  $n=3$ ) mientras que el efecto menor se produjo sobre  $K_{v4.3}$ -KChIP3 ( $30.1 \pm 3.7$  %;  $n=8$ ;  $p>0.05$ ). Sin embargo, el porcentaje de bloqueo medido como la disminución de la carga eléctrica fue siempre mayor que el bloqueo medido como la disminución de la magnitud del pico máximo de la corriente, aunque estas diferencias sólo fueron significativas en el caso de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3. En este caso, el mayor porcentaje de bloqueo se obtuvo en los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3 ( $55.5 \pm 4.3$ %  $K_{v4.3}$ -KChIP3 vs.  $48.9 \pm 6.1$  %  $K_{v4.3}$ -KChIP2 vs.  $45.6 \pm 6.9$  %  $K_{v4.3}$ ), pero no hubo diferencias significativas entre los canales de estudio en ningún caso (Tabla 8).

Al igual que la Repaglinida, el CL-888 acelera el proceso de inactivación de la corriente generada por  $K_{v4.3}$ ,  $K_{v4.3}$ -KChIP2 y  $K_{v4.3}$ -KChIP3 de forma diferente en cada caso (Figura 34). Así, en los canales  $K_{v4.3}$  la constante de tiempo de inactivación rápida ( $\tau_{inac,fast}$ ) disminuyó desde  $17.3 \pm 2.9$  ms en situación control a  $9.0 \pm 1.9$  ms ( $n=3$ ;  $p>0.05$ ) en presencia de CL-888 100 nM. En los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2 y  $K_{v4.3}$ -KChIP3 que presentan una cinética de inactivación monoexponencial en situación control, el CL-888 aceleró este proceso añadiendo un componente de inactivación rápida y convirtiéndolo en biexponencial. De este modo, en los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2 la  $\tau_{inac}$  fue de  $54.0 \pm 1.2$  ms en control y la  $\tau_{inac,slow}$  de  $65.6 \pm 4.6$  ms en presencia de CL-888 100 nM ( $n=4$ ;  $p>0.05$ ); y en los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3 de  $72.3 \pm 9.7$  ms en situación control y de  $58.5 \pm 1.5$  ms ( $n=3$ ;  $p>0.05$ ) en presencia de CL-888.

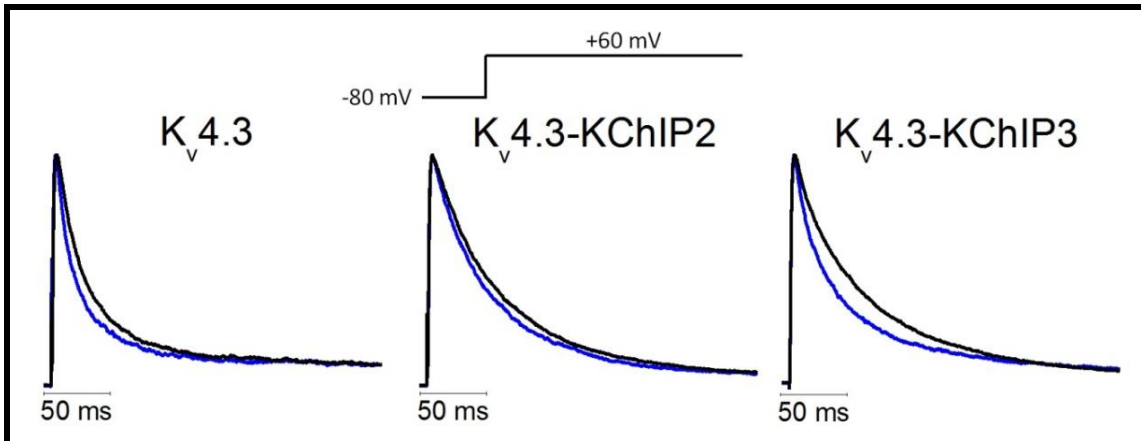
**Tabla 8. Grado de bloqueo de los canales  $K_{v4.3}$ ,  $K_{v4.3}$ -KChIP2 y  $K_{v4.3}$ -KChIP3 inducido por CL-888 100 nM medido en el pico máximo de la corriente a +60 mV y como disminución de la carga a través de la membrana a +60 mV.**

Canal	Pico	Área
$K_{v4.3}$	$37.1 \pm 7.3$	$45.6 \pm 6.9$
$K_{v4.3}$ -KChIP2	$37.4 \pm 5.6$	$48.9 \pm 6.1$
$K_{v4.3}$ -KChIP3	$30.1 \pm 3.7$	$55.5 \pm 4.3^*$

Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3-8 experimentos. \*  $p<0.05$ , diferencias estadísticamente significativas comparado con el bloqueo en el pico.

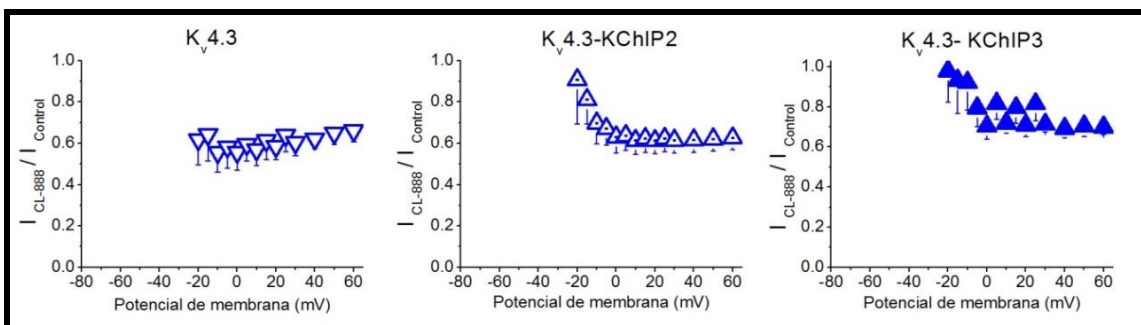


**Figura 33. Dependencia de voltaje del bloqueo inducido por CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. A, C y E.** Trazos originales producidos por  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (C) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (E) en ausencia (negro) y en presencia (azul) de CL-888 100 nM, tras la aplicación del protocolo de IV que se representa en la parte superior de la figura. **B, D y F.** Relación IV de la corriente  $K_v4.3$  (B),  $K_v4.3$ -KChIP2 (D) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (F) generada en presencia (azul) y en ausencia (negro) de CL-888 100 nM. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3-8 experimentos. **G.** Diagrama de barras representando el porcentaje de bloqueo inducido por CL-888 100 nM sobre  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3, medido como disminución en el pico máximo de la corriente (gris oscuro) y como disminución de la carga (gris claro).



**Figura 34. Efectos de CL-888 sobre la cinética de inactivación de las corrientes generadas por  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.** Se representan los trazos normalizados para mostrar las diferencias en las cinéticas de inactivación en ausencia (trazo negro) y presencia (trazo azul) de CL-888 100 nM, tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 250 ms de duración desde -80 mV a +60 mV.

Para estudiar la posible dependencia de voltaje del bloqueo inducido por CL-888, representamos la relación  $I_{CL-888} / I_{Control}$  frente al potencial de membrana de cada pulso para cada canal en estudio (Figura 35). CL-888 produjo en todos los casos un bloqueo que aumentó en el rango de potenciales de apertura de los canales. A potenciales más positivos de 0 mV, el grado de bloqueo se mantuvo prácticamente constante para los canales  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3, mientras que aumentó ligeramente en el caso de  $K_v4.3$ .



**Figura 35. Corriente relativa para CL-888 en los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.** Para cada caso, la corriente relativa se representa como  $I_{CL-888} / I_{Control}$ , frente al potencial de membrana, en presencia de CL-888 100 nM. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3-8 experimentos.

#### 4.6.1. Efectos de CL-888 sobre la cinética de activación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3.

En cuanto a las curvas de activación, el CL-888 (100 nM) no modificó de forma estadísticamente significativa las curvas de activación de ninguno de los tres canales de estudio (Figura 36). Además, el CL-888 no cambió la  $\tau_{Act}$  ni el tiempo al pico de ninguno de los canales objeto de estudio, por lo que no tuvo efectos sobre la cinética de activación de los mismos (Tabla 9).

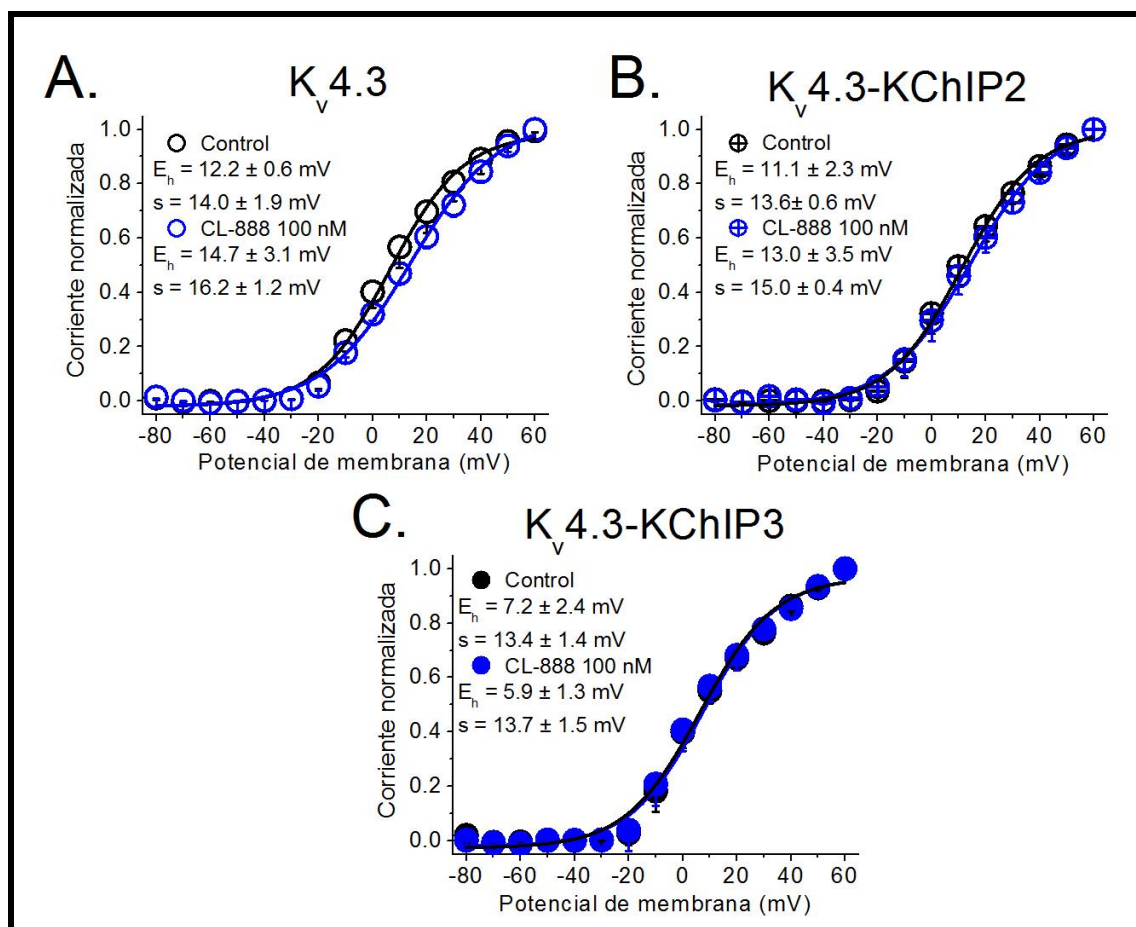


Figura 36. Curvas de activación de los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) obtenidas en ausencia (negro) y presencia (azul) de CL-888 100 nM. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M de 4-7 experimentos.

Tabla 9. Tiempo al pico (ms) y constante de tiempo de activación ( $\tau_{Act}$ ) (ms) de la corriente generada por los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 tras la aplicación de pulsos despolarizantes a +60 en ausencia y presencia de CL-888 100 nM.

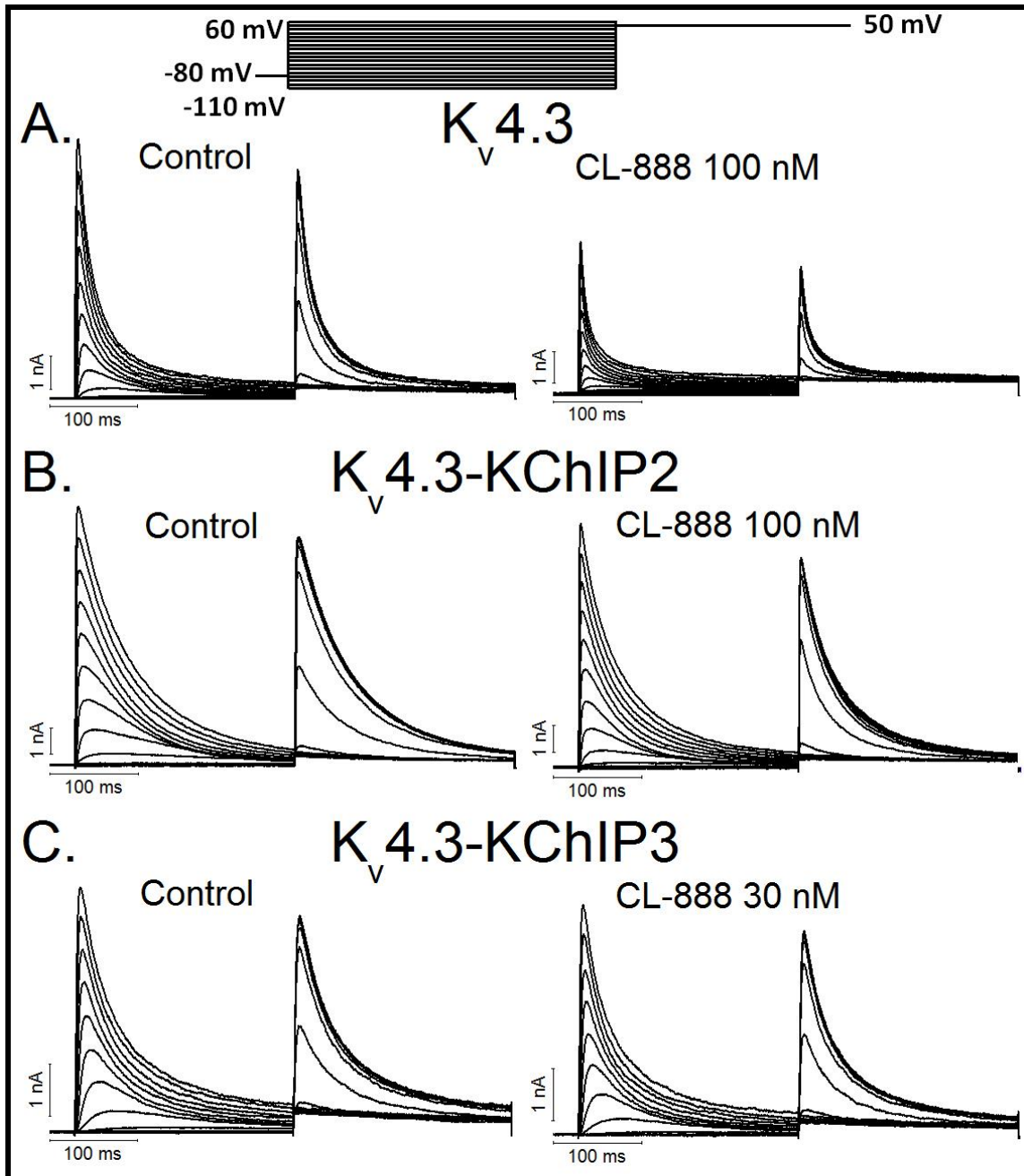
Canal	Control			CL-888		
	$K_v4.3$	$K_v4.3$ -KChIP2	$K_v4.3$ -KChIP3	$K_v4.3$	$K_v4.3$ -KChIP2	$K_v4.3$ -KChIP3
Tiempo a pico	$3.5 \pm 1.0$	$4.5 \pm 0.6$	$3.9 \pm 0.6$	$2.5 \pm 0.7$	$3.6 \pm 0.6$	$2.0 \pm 0.1$
$\tau_{Act}$	$1.0 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.09$	$0.9 \pm 0.08$	$1.0 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.04$

Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 4-5 experimentos.



4.6.2. Efectos de CL-888 sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3.

La Figura 37 muestra los registros originales de las corrientes generadas por  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) en ausencia y en presencia de CL-888 100 nM en el caso de  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 y de CL-888 30 nM en el caso de  $K_v4.3$ -KChIP3. Tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura y analizar los datos obtenidos, se consiguieron las curvas de inactivación de las corrientes respectivas en ausencia y presencia del compuesto (Figura 38).



**Figura 37.** Efectos de CL-888 sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Trazos originales de las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) en ausencia y presencia de CL-888 100 nM para  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 y de CL-888 30 nM para  $K_v4.3$ -KChIP3, tras la aplicación del protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura.

En el caso de  $K_v4.3$  el CL-888 modificó la curva de inactivación desplazando el valor  $E_h$  hacia potenciales más electronegativos, desde  $-29.4 \pm 1.2$  mV hasta  $-36.2 \pm 1.7$  mV ( $n=3$ ;  $p<0.05$ ). Sin embargo, el valor de la pendiente no se vio significativamente modificado por el fármaco pasando de  $5.0 \pm 0.2$  mV en control a  $5.7 \pm 0.2$  mV en presencia de CL-888 ( $n=3$ ,  $p>0.05$ ) (Figura 38A).

Para  $K_v4.3$ -KChIP2 el CL-888 tuvo efectos similares, modificando los valores de  $E_h$  hacia potenciales más electronegativos que los obtenidos en situación control. Así, mientras que en ausencia de compuesto el punto medio de inactivación fue de  $-14.5 \pm 1.4$  mV y la pendiente de  $4.4 \pm 0.2$  mV, en presencia de CL-888 100 nM estos valores fueron de  $-22.5 \pm 3.2$  mV ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ) y  $4.5 \pm 0.1$  mV ( $n=5$ ,  $p>0.05$ ), respectivamente (Figura 38B).

En el caso de  $K_v4.3$ -KChIP3 el CL-888 (30 nM) también es capaz de desplazar la curva de inactivación hacia valores más electronegativos. Así, el valor de  $E_h$  pasa de  $-18.9 \pm 0.2$  mV en situación control a  $-22.7 \pm 1.7$  mV en presencia de CL-888 ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ). La pendiente de la curva de inactivación no sufrió modificaciones, presentando valores de  $4.4 \pm 0.1$  mV en ausencia de compuesto y de  $4.2 \pm 0.1$  mV ( $n=6$ ;  $p>0.05$ ) en presencia del mismo (Figura 38C).

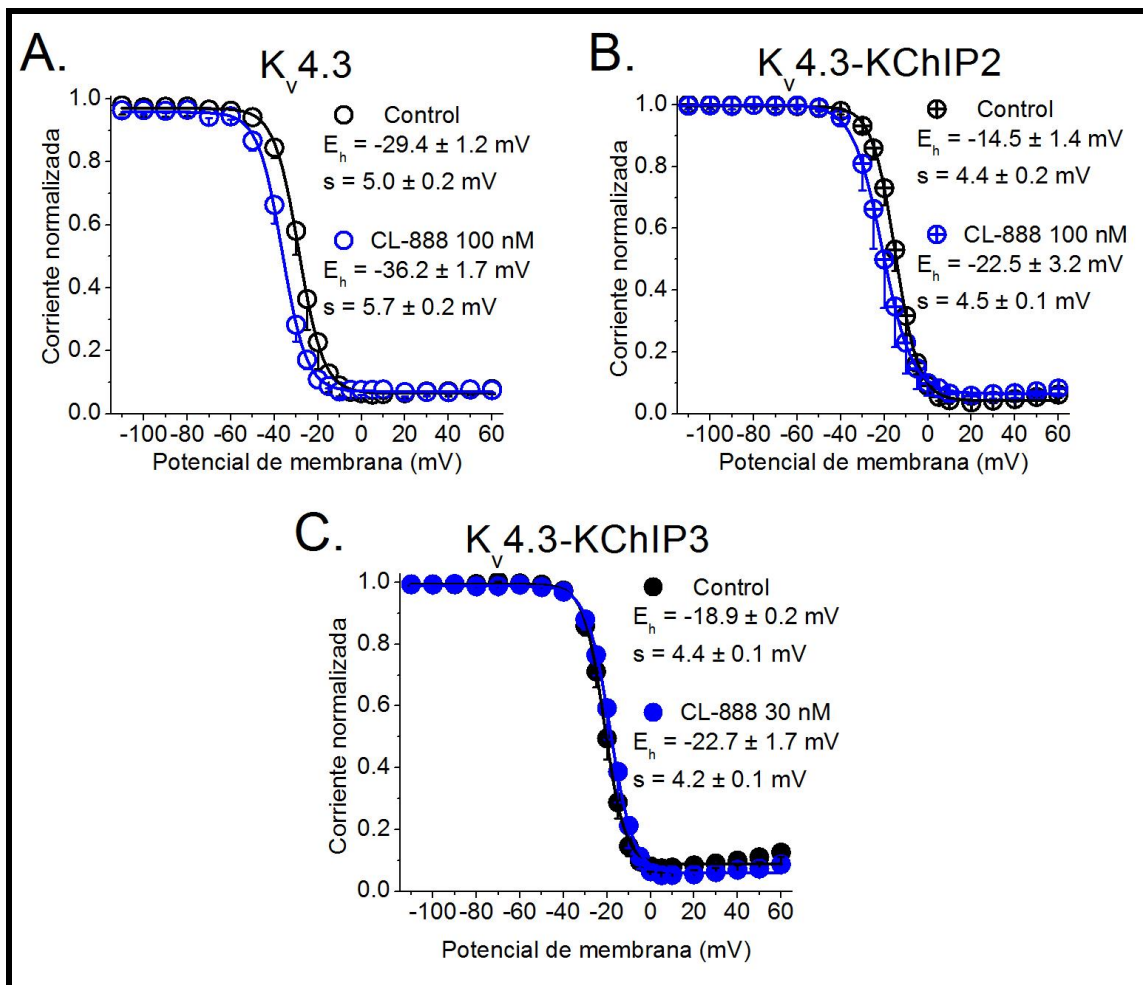
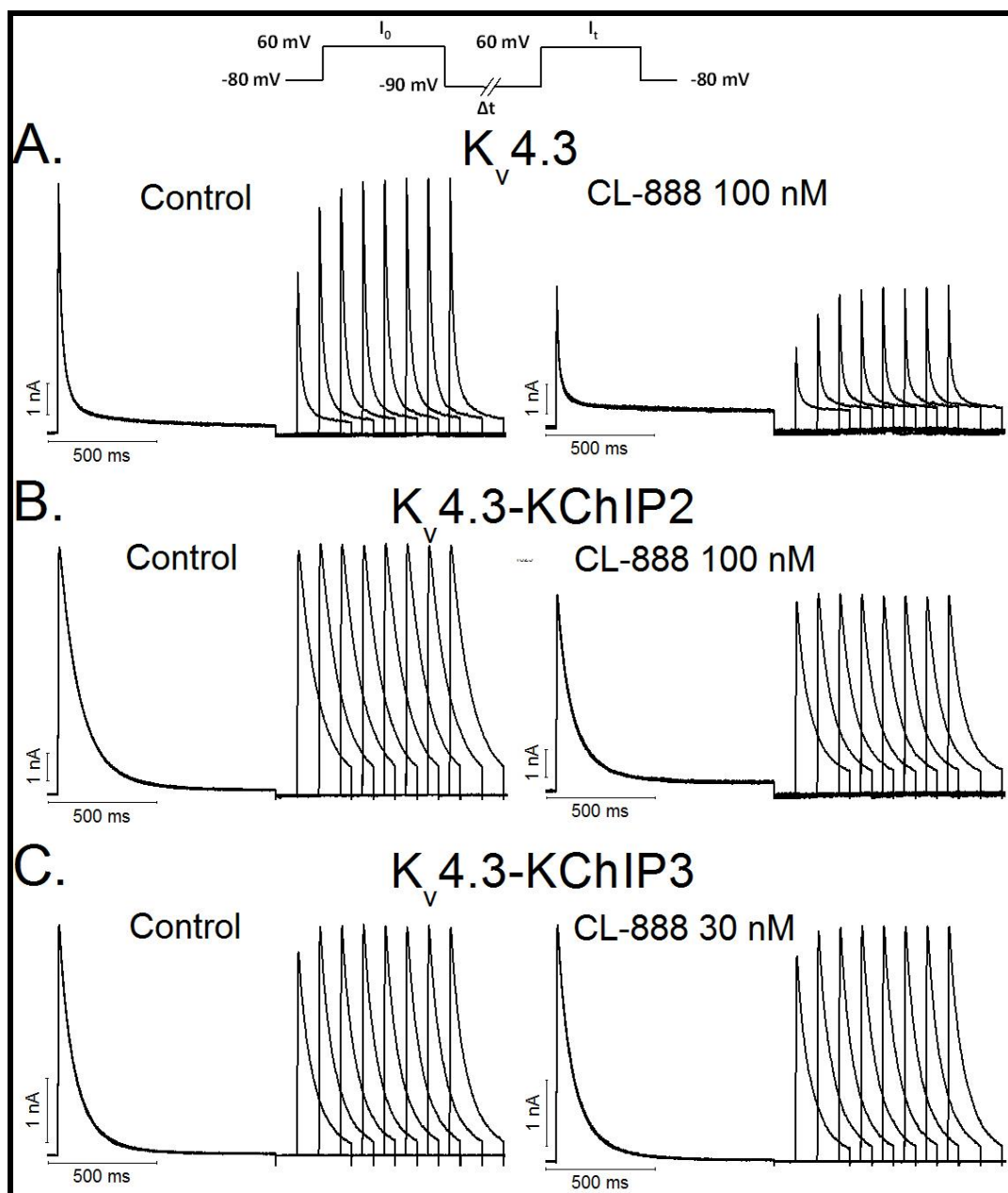


Figura 38. Curvas de inactivación de  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) obtenidas en ausencia (negro) y presencia (azul) de CL-888 100 nM en el caso de  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 y de CL-888 30 nM en el caso de  $K_v4.3$ -KChIP3. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M de 3-10 experimentos.

#### 4.6.3. Efectos de CL-888 sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales $K_v4.3$ , $K_v4.3$ -KChIP2 y $K_v4.3$ -KChIP3.

En la Figura 39 se muestran las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3 tras aplicar el protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura y que nos sirve para estudiar la cinética de recuperación de la inactivación. Los datos conseguidos se ajustaron a una ecuación monoexponencial obteniendo los valores de la constante de tiempo de recuperación en ausencia y en presencia de CL-888 100 nM en el caso de  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 y de CL-888 30 nM en el caso de  $K_v4.3$ -KChIP3.



**Figura 39.** Efectos de CL-888 sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Registros de las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) en ausencia y presencia de CL-888 100 nM para  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 y de CL-888 30 nM para  $K_v4.3$ -KChIP3, tras la aplicación del protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura.

En las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$ , el CL-888 no produjo efectos significativos sobre la cinética de recuperación de la inactivación. Los valores de  $\tau_{rec}$  fueron de  $112.5 \pm 10.3$  ms en ausencia de compuesto a  $145.5 \pm 12.7$  ms ( $n=3$ ,  $p>0.05$ ) en presencia del mismo (Figura 40A).

El CL-888 tampoco tuvo efectos significativos sobre la cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. De este modo los valores de  $\tau_{rec}$  obtenidos fueron de  $28.7 \pm 4.0$  ms en control y de  $42.3 \pm 4.7$  ms ( $n=5$ ,  $p>0.05$ ) en presencia de CL-888 100 nM en el caso de  $K_v4.3$ -KChIP2 (Figura 40B). Para  $K_v4.3$ -KChIP3, los valores de la  $\tau_{rec}$  fueron de  $49.2 \pm 9.9$  ms y de  $62.0 \pm 12.1$  ms ( $n=6$ ,  $p>0.05$ ) en ausencia y presencia de CL-888 30 nM respectivamente (Figura 40C)

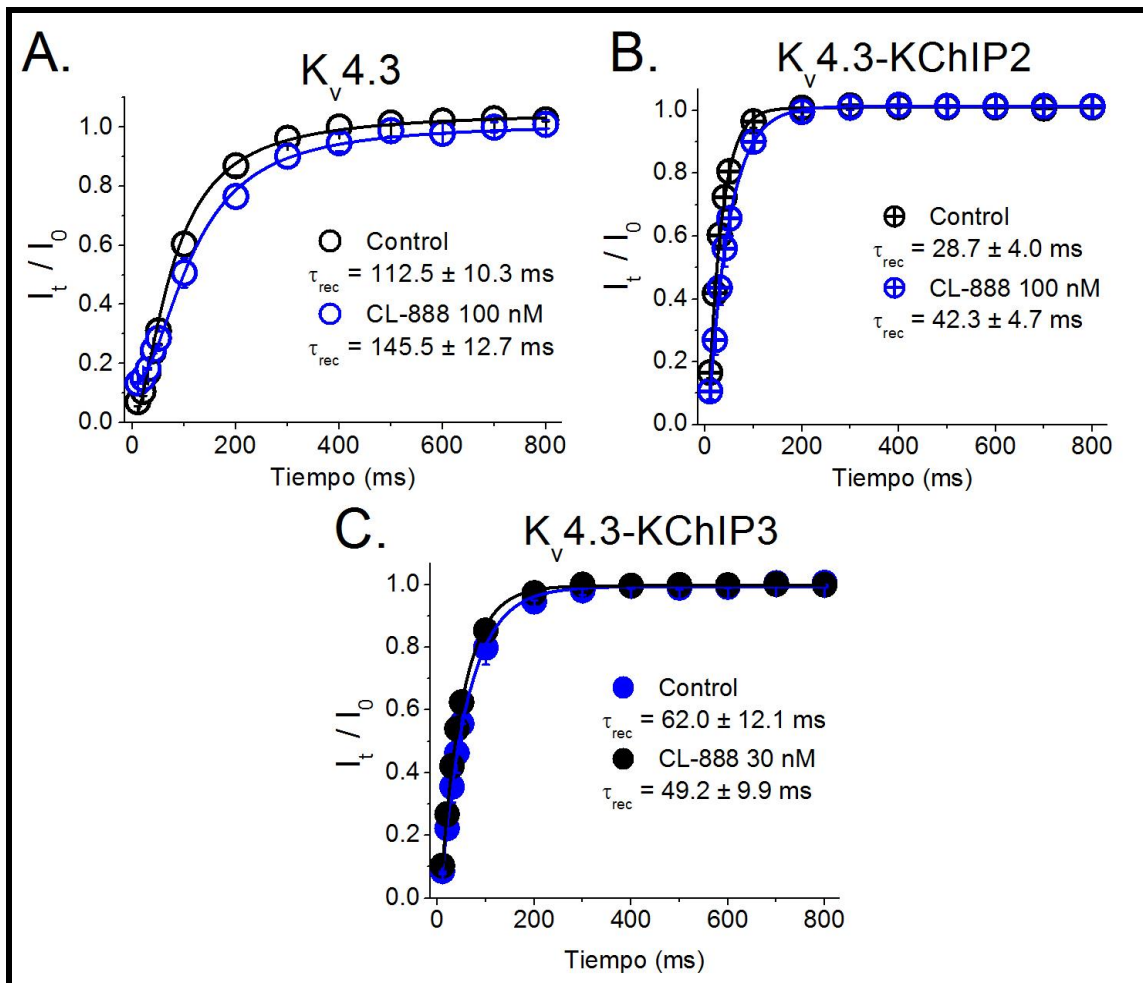
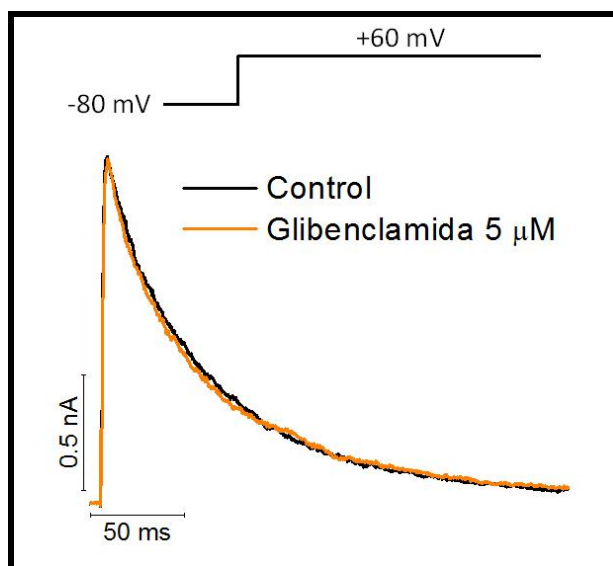


Figura 40. Cinética de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$  (A),  $K_v4.3$ -KChIP2 (B) y  $K_v4.3$ -KChIP3 (C) obtenidas en ausencia (negro) y presencia (azul) de CL-888 100 en el caso de  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2, y de CL-888 30 nM en el caso de  $K_v4.3$ -KChIP3. Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M de 3-10 experimentos.

#### 4.7. EFECTOS DE LA GLIBENCLAMIDA SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3.

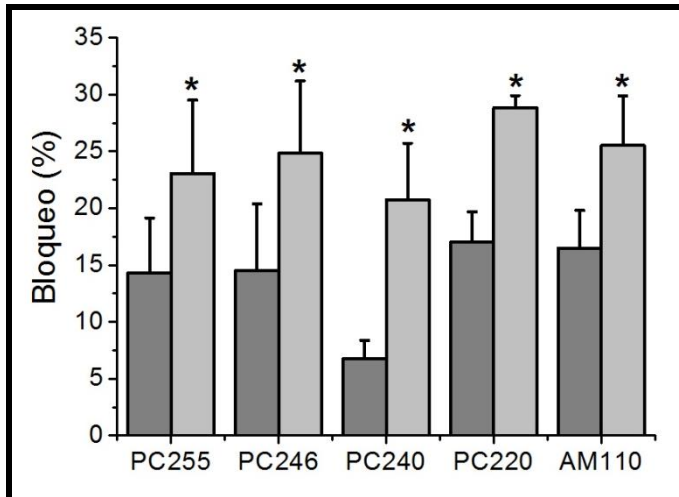
La Glibenclamida es un fármaco antidiabético que ejerce su mecanismo de acción tras interactuar con los canales de  $K^+$  dependientes de ATP y el receptor de sulfonilureas (SUR1) asociado al mismo [302-305], presente en células beta pancreáticas. Esta inhibición provoca una despolarización de la membrana plasmática que conduce a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que provoca un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y la subsecuente estimulación de la liberación de insulina. Así pues, utilizamos la Glibenclamida como control negativo de los experimentos realizados con Repaglinida sobre las corrientes generadas por la activación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3. En la Figura 41 se puede observar que la Glibenclamida no tiene efectos sobre la corriente  $K_v4.3$ -KChIP3.



**Figura 41. Efectos de la Glibenclamida sobre los canales  $K_v4.3$ -KChIP3.** Se representan los trazos originales obtenidos tras la aplicación de un pulso despolarizante a +60 mV desde el potencial de reposo a -80 mV. Se registraron las corrientes en condiciones control y tras la perfusión de las células con Glibenclamida 5  $\mu$ M.

#### 4.8. EFECTOS DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3.

Con el objetivo de conseguir compuestos capaces de tener un efecto específico sobre la subunidad reguladora KChIP3, se probó una batería de moléculas derivadas químicamente del CL-888 sobre los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 (Figura 42). Se estudiaron los efectos de PC255, PC246, PC240, PC220 y AM110 a una concentración de 10 nM. En todos los casos, el bloqueo medido como disminución de la carga siempre fue mayor que el bloqueo medido al pico, al igual que ocurre con la Repaglinida y el CL-888. Además, todos los compuestos ensayados resultaron ser menos potentes que el CL-888 y ninguno alcanzó un bloqueo superior al 28% medido al área ni al 17% medido al pico. Por otro lado, ninguno tuvo efectos sobre la cinética de inactivación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3. Debido a su baja potencia no resultaron ser candidatos adecuados para continuar el estudio.



**Figura 42. Efectos de compuestos derivados del CL-888 sobre los canales Kv4.3-KChIP3.** Diagrama de barras representando el porcentaje de bloqueo producido por PC255, PC246, PC240, PC220 y AM1110 10 nM sobre las corrientes generadas por los canales Kv4.3-KChIP3. El bloqueo se midió como la disminución en el pico máximo de la corriente (gris oscuro) y como la disminución de la carga (gris claro). Los datos se representan como la media  $\pm$  E.E.M. de 3-6 experimentos. \* $p < 0.05$ , diferencias estadísticamente significativas comparado con el bloqueo al pico.

## **5. DISCUSIÓN**

### 5.1. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS CANALES $K_v4.3$ -KChIP3.

Un requerimiento imprescindible para la realización de esta Tesis Doctoral era realizar una caracterización electrofisiológica de los canales  $K_v4.3$ ,  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3, con el fin de poder detectar cualquier posible efecto de los fármacos de estudio sobre los mismos. Mientras que las características electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$  y  $K_v4.3$ -KChIP2 ya están descritas [61, 113, 217, 218, 316, 317], las características electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3, no han sido analizadas.

La expresión de los canales  $K_v4.3$  en células CHO mostró una corriente con unas características electrofisiológicas que presentan similitudes pero también rasgos distintivos si se comparan con las descritas en otras líneas celulares de mamífero (*Ltk* o HEK293) [61, 316]. Además, sus características se corresponden en gran medida con las características fisiológicas de la corriente  $I_{to}$  registrada en miocardio humano [61, 177, 316, 318]. Así, nuestros registros de  $K_v4.3$  muestran una corriente con una cinética de activación muy rápida. La cinética de inactivación se ajustó a un proceso biexponencial en la que la  $\tau_{fast}$  alcanzó un valor de  $\approx 20$  ms, valores muy similares a los que muestra la  $I_{to}$  en aurícula y ventrículo humanos y en células *Ltk* [61, 316]. El hecho de que la cinética de inactivación presente dos componentes se debe a que los canales  $K_v4.3$  sufren un proceso de inactivación bastante más complejo que la inactivación de tipo-N característica de algunos canales con inactivación rápida. De hecho, los canales  $K_v4.3$  pasan desde los distintos estados cerrados a diversos estados inactivos, mientras que la inactivación tipo-N requiere la transición del canal desde el estado abierto, antes de entrar en el estado inactivo del mismo [62, 78, 80-82, 85, 191]. En cuanto a la dependencia de voltaje de la inactivación, el potencial medio de inactivación alcanzó un valor de  $\approx -29$  mV, lo que se corresponde con los valores obtenidos en aurícula y ventrículo humanos y en células *Ltk* pero difiere de otros modelos experimentales como células HEK293 o ventrículos de rata, perro y conejo [61, 177, 318-324]. La cinética de recuperación de la inactivación de las corrientes tipo-A ( $I_{to}$  cardíaca e  $I_A$  neuronal) presentes en células excitables humanas es un proceso muy rápido, con una constante de tiempo del orden de 30 ms [318, 320]. Por el contrario, el proceso de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$  es un proceso mucho más lento [74, 113, 221], dependiente de voltaje, siendo más rápido a medida que el potencial de la membrana es más electronegativo. Esta dependencia de voltaje de la recuperación se asemeja a la observada en la corriente  $I_{to}$  nativa, aunque el valor de la  $\tau_{rec}$  es unas 2 veces más lento. Esto puede deberse a la existencia de subunidades reguladoras que se unen al canal para regular las propiedades del mismo y generar la  $I_{to}$  *in vivo*. El valor de la  $\tau_{rec}$  obtenido en células CHO es muy distinto al observado en otros modelos experimentales. Todos estos datos indican que el modelo experimental empleado influye en las características de los canales de estudio.



Las características electrofisiológicas de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3 expresados en células de mamífero no han sido descritas hasta la fecha. Nuestros resultados demuestran que la subunidad reguladora KChIP3 acelera el proceso de activación de los canales  $K_{v4.3}$  mientras que retrasa el proceso de inactivación, que pasa a ser un proceso monoexponencial. Estos efectos podrían explicarse porque las subunidades KChIP interactúan con los extremos amino-terminal de  $K_{v4.3}$  [78, 79, 81], y estos están implicados en la primera fase de inactivación rápida del proceso de inactivación biexponencial característico de los canales  $K_{v4}$  [62, 92, 93, 97]. En cuanto a la dependencia de voltaje de la inactivación, KChIP3 no modifica la dependencia de voltaje de la inactivación, en cambio sí es capaz de desplazar la curva de activación hacia potenciales de membrana más electronegativos. El proceso de recuperación de la inactivación resultó ser mucho más rápido que el de los canales  $K_{v4.3}$  solo. Por lo tanto, la subunidad reguladora KChIP3 acelera la activación y la recuperación de la inactivación de los canales  $K_{v4.3}$ , al mismo tiempo que enlentece el proceso de inactivación.

Si comparamos las propiedades electrofisiológicas de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3 con las de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2, observamos algunas diferencias significativas entre ellas. Así, aunque el proceso de inactivación es monoexponencial en ambos casos, KChIP3 lo hace aún más lento que la subunidad KChIP2. El proceso de activación resultó ser más rápido en presencia de KChIP3. De hecho, los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2 exhiben un proceso de activación muy semejante al de los canales  $K_{v4.3}$  sin subunidades reguladoras. Sin embargo, la recuperación de la inactivación fue más rápida en presencia de KChIP2. Existe una gran homología estructural entre las distintas moléculas de KChIP, que difieren básicamente en la secuencia de sus extremos amino-terminal [88, 89, 325, 326]. Por lo tanto, debe existir alguna diferencia en los extremos amino-terminal de las moléculas de KChIP2 y KChIP3 que hace que afecten de forma diferente a las propiedades electrofisiológicas de los canales  $K_{v4.3}$ .

## 5.2. EFECTOS DE REPAGLINIDA Y CL-888 SOBRE LOS CANALES $K_{v4.3}$ , $K_{v4.3}$ -KChIP2 Y $K_{v4.3}$ -KChIP3.

Hasta fechas recientes, se consideraba que la Repaglinida era el único fármaco capaz de unirse específicamente a proteínas NCS y bloquear su actividad [312]. Recientemente se ha descrito que las fenotiazinas, usadas ampliamente en el tratamiento de la esquizofrenia y otros tipos de psicosis [327-331], también son capaces de interactuar con las proteínas NCS inhibiendo su función [331]. Por otro lado, el CL-888 ha sido identificado como el único compuesto descrito capaz de alterar la interacción de la subunidad reguladora KChIP (en concreto KChIP1) con los canales  $K_{v4.3}$  [238]

Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3 producido por Repaglinida aumenta en el rango de potenciales de membrana correspondientes con los de la apertura del canal. Esto podría indicar que el fármaco requiere la previa activación del canal para poder unirse a su sitio receptor. La Repaglinida acelera la cinética de inactivación de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3, haciéndola biexponencial, de modo que la corriente se asemeja a la generada por los canales  $K_{v4.3}$  sin subunidades reguladoras. Debido a esto, el efecto inhibitorio de Repaglinida es mayor sobre la cantidad de carga que atraviesa la membrana que sobre la magnitud máxima de la corriente. Además, la Repaglinida no tuvo efectos sobre la cinética de activación de los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3 ni sobre la recuperación de la inactivación; pero, en cambio, fue capaz de desplazar la curva de inactivación hacia potenciales más electronegativos. La Repaglinida tuvo los mismos efectos sobre los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2 que sobre  $K_{v4.3}$ -KChIP3, excepto que resultó ser ligeramente más potente sobre  $K_{v4.3}$ -KChIP2 a pesar de tener menor afinidad.

La Repaglinida inhibió la corriente generada por  $K_{v4.3}$ , aunque en menor medida que la generada por  $K_{v4.3}$ -KChIP2 y  $K_{v4.3}$ -KChIP3, sin modificar las características electrofisiológicas de esta corriente. La diferencia principal en cuanto al bloqueo de la corriente  $K_{v4.3}$  radica en que este no fue dependiente de voltaje, de manera que no aumenta a potenciales electropositivos, sino que permanece constante a potenciales de membrana positivos a 0 mV. Estos resultados indican que la Repaglinida se une preferentemente a las subunidades reguladoras, aunque también en menor medida al canal. El hecho de que los efectos de la Repaglinida sobre el canal sean diferentes a los observados en presencia de subunidades reguladoras, indica que el fármaco no se une al estado abierto del canal. Así, la Repaglinida actuaría uniéndose a las subunidades reguladoras e impidiendo que estas ejercieran sus efectos sobre los canales  $K_{v4.3}$ . El hecho de que la Repaglinida disminuya la magnitud de las corrientes  $K_{v4.3}$ -KChIP3 y  $K_{v4.3}$ -KChIP2, acelere la inactivación y que produzca una inhibición de la corriente dependiente de voltaje (mayor a potenciales más electronegativos); sugiere que el compuesto se une preferentemente al estado cerrado del canal. El hecho de que la transición al estado inactivo se realiza a partir de los estados cerrados del canal, explica que la curva de inactivación se desplace hacia valores más electronegativos.

Estos resultados sugieren que la Repaglinida podría interactuar estructuralmente con KChIP3 dificultando su unión al canal  $K_v4.3$ . Recientemente se ha descrito que las fenotiazinas, que al igual que la Repaglinida son moléculas de pequeño tamaño, son capaces de interactuar con la proteína NCS-1 a través del extremo C-terminal de la hélice H10, impidiendo así su interacción con otras proteínas. Parece ser que en las NCS, la hélice H10 se localiza en un surco hidrofóbico de la molécula y ha de salir del mismo para el reconocimiento e interacción con otras proteínas. La interacción de la fenotiazina con la hélice H10 la estabiliza dentro del surco, bloqueando su exposición en superficie y, por lo tanto, la interacción con la proteína diana [331]. La familia de proteínas NCS está formada por 16 miembros que presentan una homología de más del 60 % en su secuencia. Todos tienen una topología similar y residuos hidrofóbicos altamente conservados en el surco de la molécula, que participan en el reconocimiento de su proteína diana [332, 333]. KChIP3, al igual que el resto de KChIPs, es una proteína de unión a  $Ca^{2+}$ . La Repaglinida podría interactuar, de un modo similar a como lo hacen las fenotiazinas, con el extremo C-terminal de la hélice H10 de KChIP3 e impedir de este modo su interacción con el canal  $K_v4.3$ . Esto explicaría que la corriente obtenida en presencia de Repaglinida se asemeje a la generada por el canal solo. Del mismo modo se podrían explicar los efectos que este fármaco produce sobre los canales  $K_v4.3$ -KChIP2.

En cuanto al CL-888, el bloqueo que produce también aumenta en el rango de potenciales de membrana correspondientes a los de apertura de los canales. En este caso, no se aprecian diferencias significativas en la inhibición de las distintas corrientes de estudio, aunque el compuesto resultó ser ligeramente más potente en presencia de KChIPs. El CL-888 modificó la cinética de inactivación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 y  $K_v4.3$ -KChIP2, que pasó de mono- a biexponencial y, por lo tanto, la aceleró. Como consecuencia, la corriente producida por estos canales adquiere una morfología semejante a la que generan los canales  $K_v4.3$ . En cuanto al resto de propiedades electrofisiológicas, el CL-888 no modificó ni la cinética de activación, ni la de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 y  $K_v4.3$ -KChIP2, sin embargo, en ambos casos, desplazó la dependencia de voltaje de la inactivación hacia potenciales más electronegativos. Los efectos de este compuesto sobre los canales  $K_v4.3$  fueron similares a los observados en presencia de cualquiera de las subunidades KChIP. Esto parece indicar que el CL-888 podría estar uniéndose al estado abierto del canal. Sin embargo, el compuesto resultó ser ligeramente más potente inhibiendo la corriente  $K_v4.3$  en presencia de subunidades reguladoras lo que sugiere que también es capaz de interactuar con KChIP3 y KChIP2. Este hecho está avalado por estudios previos que demuestran que el CL-888 es capaz de interactuar con KChIP1 e impedir su unión a los canales  $K_v4$  [238]. Se ha demostrado que el extremo amino-terminal de los canales  $K_v4$  interactúa con la cara hidrofóbica de la molécula de KChIP correspondiente. Parece ser que el CL-888 se une cerca de un residuo de triptófano de un pequeño surco de esa cara hidrofóbica de la molécula de KChIP1, por lo que dificulta su unión al canal [238]. No está claro si esta unión altera las características del complejo

subunidad reguladora-canal, o si provoca la disociación del complejo de manera dependiente de concentración. De esta forma, el CL-888 se uniría a KChIP3 y KChIP2 dificultando su unión a Kv4.3 y haciendo que la corriente generada por estos canales adquiriera características similares a la producida por el canal solo.

### 5.3. PAPEL DE KChIP3 Y KChIP2 COMO POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS.

Las arritmias cardíacas son una de las causas principales de muerte en los países desarrollados [334, 335]. En muchos casos la letalidad de estas arritmias está asociada a enfermedades cardíacas tales como la insuficiencia o la hipertrofia cardíaca [336-338]. Numerosos estudios han demostrado que anomalías en diversos canales iónicos dan lugar a múltiples tipos de arritmias [339, 340].

La corriente  $I_{to}$  es responsable de la fase de repolarización temprana del potencial de acción cardíaco y determina la duración del mismo [225, 341, 342]. Además, se ha demostrado que la  $I_{to}$  presenta un gradiente de expresión altamente conservado a través de la pared ventricular, siendo mayor su expresión en el epicardio [171, 343, 344]. La reducción de esta corriente es un rasgo característico de diversas patologías cardíacas incluido el infarto de miocardio, la fibrilación auricular y la insuficiencia cardíaca [102, 174, 345-347]. Esta reducción de la  $I_{to}$  produce un aumento significativo en la duración del potencial de acción. Esta disminución en la corriente  $I_{to}$  normalmente se asocia a una disminución en los niveles de expresión de la proteína KChIP2, que es la que determina el gradiente de la corriente a través de la pared ventricular [101, 345, 348]. Ha sido demostrado que la pérdida del gradiente de  $I_{to}$  confiere una mayor susceptibilidad a arritmias [349-351]. Así, se ha demostrado que la disminución de la expresión de KChIP2 es un evento común en situaciones de estrés cardíaco [352, 353]. De hecho, la expresión ventricular del mRNA de KChIP2, así como los niveles de esta proteína, están muy reducidos en pacientes con insuficiencia cardíaca [108, 354, 355]. En estos pacientes, la reducción en la  $I_{to}$  aumenta la sensibilidad del miocardio a otros factores pro-aritmicos, de forma que aumenta el riesgo de muerte súbita. Se ha observado una reducción similar en los niveles de KChIP2 y, en consecuencia, de la corriente  $I_{to}$  en modelos experimentales de hipertrofia cardíaca [353-355].

Estudios recientes demuestran que, de manera similar a KChIP3, KChIP2 también tiene una función transcripcional importante, lo que hace que tenga una implicación mayor en la biología cardíaca que la que se consideraba hasta la fecha [356]. De hecho, mediante experimentos de silenciamiento ha sido demostrado que KChIP2 regula la expresión de más de 600 genes [356]. Además, muchos de estos genes contienen secuencias DRE y, dada la amplia homología que existe entre ellos, se cree que KChIP2 actuaría como factor de transcripción de un modo muy semejante a como lo hace KChIP3. Se ha comprobado que un número amplio de vías de señalización están implicadas en la respuesta a la disminución de KChIP2, incluida la señalización cardiovascular, la señalización por receptores acoplados a proteína G, los mecanismos de relajación y contracción, la señalización TGF $\beta$  y la señalización apoptótica [356]. Por tanto, KChIP2 actúa como un regulador de la fisiología cardíaca y su implicación en las distintas patologías cardíacas no sólo se debe a su papel como regulador de canales iónicos. Así, la búsqueda de nuevas estrategias encaminadas a mantener los niveles de la corriente  $I_{to}$  a través de un aumento del nivel de expresión de KChIP2 presenta un gran interés clínico, y las subunidades KChIP2 representan una nueva diana terapéutica para el tratamiento de las patologías cardíacas.

Nuestros resultados demuestran que la Repaglinida es más potente sobre los canales  $K_{V4.3}$ -KChIP2 a pesar de tener mayor  $CI_{50}$ , por lo tanto, menor afinidad, que sobre  $K_{V4.3}$ -KChIP3. Además, es capaz de modificar las propiedades cinéticas de estos canales haciendo que se asemejen a las de los canales  $K_{V4.3}$ . Como hemos mencionado, los niveles bajos de expresión de KChIP2 se relacionan con múltiples patologías cardíacas. La inhibición de los efectos de KChIP2 sobre los canales  $K_{V4.3}$  por la Repaglinida, conllevaría una disminución de la corriente  $I_{to}$ , lo que incrementaría el riesgo de arritmias y por tanto, de enfermedad cardiovascular. De hecho, la terapia antidiabética se ha asociado a un mayor riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes de tipo 2 [357, 358]. Por consiguiente, el uso de la Repaglinida puede tener efectos nocivos sobre el miocardio de los pacientes.

El compuesto CL-888 también es capaz de bloquear la corriente generada por los canales  $K_{V4.3}$ -KChIP2 aunque presenta una afinidad mucho menor que la Repaglinida. De este modo, también sería capaz de causar una disminución de la corriente  $I_{to}$  en los miocitos cardíacos, lo que aumentaría el riesgo de desarrollar patologías cardíacas.

Recientemente se han descrito dos nuevas mutaciones en el gen *KCND3* relacionadas con el Síndrome de Brugada. Estas mutaciones dan lugar a una ganancia de función de los canales  $K_{V4.3}$ , lo que conlleva una prolongación en la duración del potencial de acción cardíaco [186, 187]. En patologías como estas, caracterizadas por un incremento en la duración del potencial de acción, el uso de compuestos como la Repaglinida y el CL-888 que son capaces de inhibir la corriente  $I_{to}$ , podría ser clínicamente beneficioso.

Las anomalías neuronales en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, el Alzheimer o el Parkinson han sido foco de numerosas investigaciones durante las últimas décadas. Este conjunto de patologías, en el que también se incluyen la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal, tienen como característica bioquímica fundamental la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en distintas áreas cerebrales [359, 360]. A nivel molecular, las proteínas plegadas anormalmente incluyen oligómeros, agregados o incluso grandes inclusiones proteicas [270, 286, 361, 362]. En la mayoría de los casos se desconoce cómo estas proteínas ejercen los efectos deletéreos propios de cada enfermedad. Por otro lado, la mayoría de estas enfermedades neurodegenerativas tienen un origen genético, no tienen cura y se caracterizan por ser patologías de desarrollo lento, cuyos síntomas pueden manifestarse años después de que la disfunción neuronal haya comenzado [264, 362-365]. Actualmente, se considera que una posible razón para ese desarrollo tardío de los síntomas asociados a la enfermedad, es la activación de mecanismos neuroprotectores endógenos que tratan de contrarrestar el fallo neuronal.

Una característica común de las enfermedades neurodegenerativas es que muchos de los procesos celulares controlados por el retículo endoplásmico (ER) están alterados [366-368]. El ER controla múltiples funciones celulares tales como la síntesis de proteínas, su plegado, modificación así como el transporte a sus localizaciones definitivas [369-371]. La pérdida de estas funciones lleva a una

situación de estrés en el ER, normalmente ocasionada por la acumulación de proteínas mal plegadas o bien por cambios en la homeostasis del calcio [286, 369, 371, 372]. El mecanismo principal contra el estrés en el ER es la denominada respuesta a proteínas mal plegadas o UPR [373, 374]. Se trata de un proceso celular protector que tiene tres funciones principales: adaptación, alarma y apoptosis [375]. Es una respuesta compleja que incluye tres vías de señalización mediadas por tres proteínas transmembrana del retículo: IRE1 (*inositol-requiring kinase 1*), PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) y ATF6 (*activating transcription factor 6*) [287, 375, 376]. La función principal de la vía mediada por PERK es la de reducir la traslación global de proteínas al ER. Así, la activación de PERK causa la fosforilación de eIF2 (factor iniciador de la traslación 2) provocando la inhibición de la síntesis global de proteínas [377-380]. Las cascadas de señalización iniciadas por IRE1 y ATF6 tienen como finalidad incrementar la supervivencia celular aumentando la capacidad de la célula para plegar proteínas mediante la inducción de chaperonas, y facilitando la eliminación de proteínas mal plegadas. ATF6 es una proteína transmembrana de tipo II. Su dominio citoplasmático es un factor de transcripción capaz de notar perturbaciones en el ER [381-383]. Cuando detecta estas alteraciones, ATF6 se transloca al Golgi donde sufre proteólisis y se libera el dominio citoplasmático. Este dominio de ATF6 se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes diana junto a otros factores de transcripción y requiere co-reguladores, tales como el factor nuclear Y (NF-Y), que incrementan la actividad de chaperonas así como la degradación de proteínas mal plegadas [286, 287, 375, 384, 385]. Anomalías en la respuesta UPR están relacionadas con múltiples desórdenes metabólicos y neurodegenerativos tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington y enfermedades priónicas, así como diabetes y enfermedad vascular [287, 368].

KChIP3, también conocido como DREAM o calsenilina, es una proteína con múltiples funciones dependiendo de su localización celular y se incluye en la subfamilia de sensores neuronales de  $Ca^{2+}$  (NCS) [386, 387]. En nuestro estudio consideramos que la disminución en los niveles de DREAM forma parte de la respuesta neuroprotectora en la enfermedad de Huntington, por lo que evaluamos su posible papel como diana terapéutica.

Como ya hemos mencionado, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la acumulación de agregados proteicos intracelulares, lo que se ha asociado a una respuesta UPR defectuosa [286, 388-390]. Se ha demostrado que en el cuerpo estriado de modelos animales (ratones R6) y pacientes con Huntington, el procesamiento de ATF6 así como la acumulación nuclear de la forma transcripcionalmente activa se encuentra disminuido [288]. Este estudio muestra una disminución de ATF6 activo en ratones jóvenes mucho antes de que aparezcan los síntomas neurológicos.

Por otro lado, el estudio del cuerpo estriado de distintos modelos de Huntington muestra una expresión reducida de los genes que codifican para proteínas implicadas en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  [391-394]. De este modo, cuando se analizan los niveles de DREAM en ratones R6 se observa que los niveles de la proteína están ampliamente reducidos en el cuerpo estriado así como en otras áreas cerebrales, incluido el hipocampo y la corteza. Esta disminución se observa tras el nacimiento o bien antes de que

aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad. En el análisis de muestras de cuerpo estriado de pacientes con Huntington se obtienen los mismos resultados [395].

Parece ser que una de las múltiples funciones de DREAM es participar en el procesamiento de ATF6. Cuando se reducen los niveles de DREAM, tal y como ocurre en Huntington, se favorece la activación de ATF6 y así se compensa parcialmente la baja actividad transcripcional de ATF6 que existe en neuronas HD. Los genes diana de ATF6 participan en el replegado de proteínas y tienen actividad antiapoptótica [375, 396], lo que apoya la idea de que los bajos niveles de expresión de DREAM juegan un papel neuroprotector en la enfermedad de Huntington.

Experimentos con ratones R6/2 demuestran que el tratamiento crónico con Glibenclamida no mejora la supervivencia, la pérdida de peso o la coordinación motora en ningún caso [397]. Nuestros experimentos demuestran que, efectivamente, la Glibenclamida no tiene ningún efecto sobre KChIP3, por lo que al no disminuir su actividad, no potencia las propiedades neuroprotectoras de esta proteína. Sin embargo, el tratamiento crónico con Repaglinida en ratones R6/2 retrasa la aparición, así como la progresión de los síntomas de la enfermedad de Huntington. Además, experimentos de inmunohistoquímica demuestran que ATF6 forma grandes y densos agregados proteicos en el cuerpo estriado de ratones R6/2 y la administración de Repaglinida es capaz de reducirlos hasta restaurar el fenotipo WT [395].

Nuestros experimentos de electrofisiología demuestran que el tratamiento con Repaglinida o CL-888 contrarresta los efectos de KChIP3 sobre los canales  $K_v4.3$  y, por tanto, sobre las corrientes de potasio neuronales de tipo A ( $I_{SA}$ ). Así, ambos compuestos reducen la amplitud del pico máximo de la corriente y, tal y como ha sido descrito en la presente Tesis Doctoral, tienen distintos efectos sobre las propiedades electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3. Si comparamos ambas moléculas, se observa que la Repaglinida presenta mayor afinidad que el CL-888 por los canales  $K_v4.3$ -KChIP3. Estudios previos de resonancia de plasmones en superficie confirman que la Repaglinida se une a KChIP3 con mayor afinidad que el CL-888 [395]. Además, ambas moléculas bloquean la corriente  $I_{SA}$  en mayor medida en presencia de KChIP3. Asimismo, aunque la Repaglinida es capaz de unirse a KChIP3, no modifica su unión a los sitios DRE *in vitro* ni altera la expresión de sus genes diana [129]. Por lo tanto, la unión de Repaglinida a DREAM afecta a las interacciones proteína-proteína con los canales de potasio  $K_v4.3$ , pero no modifica otras funciones de DREAM tales como su interacción con el DNA. La Repaglinida es capaz de unirse a DREAM y bloquear sus efectos sobre las corrientes de tipo A al mismo tiempo que puede interrumpir su interacción con ATF6, lo que favorece la acumulación nuclear de ATF6 activo y la expresión de sus genes diana.

Por lo tanto, la disminución temprana de los niveles de expresión de DREAM en la enfermedad de Huntington, promueve mecanismos neuroprotectores a través de la activación de la señalización vía ATF6 y en consecuencia, promoviendo la actividad pro-supervivencia de la respuesta UPR. De esta forma, la identificación de moléculas que sean capaces de unirse a DREAM con mayor afinidad y selectividad



podrían mejorar la eficacia terapéutica, retrasando la aparición de la enfermedad o incluso mejorando la sintomatología en pacientes con Huntington. Basándonos en esto, se podría concluir que la Repaglinida sería un posible candidato para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, la Repaglinida no es selectiva para los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3, inhibiendo también la corriente generada por los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP2 y aumentando la susceptibilidad al desarrollo de patologías cardíacas. Por consiguiente, el uso de la Repaglinida como agente neuroprotector disminuyendo la actividad de KChIP3, podría tener efectos nocivos importantes sobre el miocardio de los pacientes. De esta forma, la Repaglinida resulta no ser un fármaco adecuado para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, pero sirve como punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos más potentes y efectivos.

De hecho, en el laboratorio de la Dra. Marta Gutiérrez Rodríguez del Instituto de Química Médica, se han diseñado nuevos compuestos a partir de la estructura molecular del CL-888 (Nº de solicitud de Patente P201431898; CSIC, CIBERNED y UAM). En esta Tesis Doctoral se han estudiado los efectos de una batería de compuestos a una concentración muy baja (10 nM) solo sobre los canales  $K_{v4.3}$ -KChIP3, no pudiendo por tanto saber si son o no selectivos para estos canales. Sin embargo, estudios paralelos con otros compuestos nos han permitido obtener datos prometedores. Así, por ejemplo, el compuesto PC332 resultó ser selectivo para  $K_{v4.3}$ -KChIP3, mientras que el PC342 no mostró selectividad [398]. Por lo tanto, la continuación de esta línea de investigación consiste en el diseño de fármacos basados en la estructura de los que resulten más selectivos y potentes en los estudios electrofisiológicos y el posterior análisis de sus efectos electrofisiológicos, con el fin de encontrar aquel que presente una alta afinidad y selectividad por DREAM.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Las características electrofisiológicas de los canales  $K_v4.3$ -KChIP3 difieren de las de los canales  $K_v4.3$  expresados sin subunidades reguladoras. Así, la subunidad KChIP3 acelera la cinética de activación y de recuperación de la inactivación de los canales  $K_v4.3$  a la vez que enlentece el proceso de inactivación.

2. La Repaglinida disminuye la magnitud de las corrientes generadas por los canales  $K_v4.3$ -KChIP2 y  $K_v4.3$ -KChIP3. Además, acelera la inactivación de la corriente y el bloqueo que produce es dependiente de voltaje, lo que sugiere que podría unirse preferentemente al estado cerrado. Esto podría explicarse por una interacción estructural entre el fármaco y la subunidad reguladora que impidiera la unión de las mismas al canal. En cambio, el CL-888, en canales ensamblados con KChIPs, produce una inhibición de la corriente que aumenta en el rango de activación del canal para después mantenerse. En ausencia de KChIPs, la inhibición producida por este compuesto disminuye a potenciales más electropositivos. Estos resultados sugieren que en presencia de KChIPs, el CL-888 presenta afinidad por el estado activo, mientras que en su ausencia de estas subunidades reguladoras pierde afinidad por el estado abierto del canal.

3. La Repaglinida es capaz de unirse a KChIP3 con mayor afinidad que el CL-888. Al unirse a KChIP3, la Repaglinida disminuye su actividad, lo que favorece la liberación de ATF6 y su posterior activación. El aumento en la actividad de ATF6 conlleva una mayor respuesta a proteínas mal plegadas. Por lo tanto, la Repaglinida es capaz de potenciar el papel neuroprotector de KChIP3 en la enfermedad de Huntington. Sin embargo, debido a su baja selectividad, la Repaglinida también es capaz de unirse a KChIP2.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. Vol. 507. 2001: Sinauer Sunderland, MA.
2. Hille, B., C.M. Armstrong, and R. MacKinnon, *Ion channels: from idea to reality*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1105-9.
3. Armstrong, C.M. and B. Hille, *Voltage-gated ion channels and electrical excitability*. Neuron, 1998. **20**(3): p. 371-80.
4. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(11): p. 660-9.
5. Hille, B., *Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches*. Biophys J, 1978. **22**(2): p. 283-94.
6. Wells, R.B., *Introduction to Biological Signal Processing and Computational Neuroscience*. 2010.
7. Fatt, P. and B. Katz, *An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode*. J Physiol, 1951. **115**(3): p. 320-70.
8. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
9. Hille, B., *The Sharpey-Schafer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles*. Q J Exp Physiol, 1989. **74**(6): p. 785-804.
10. Gambardella, A. and A. Labate, *The role of calcium channel mutations in human epilepsy*. Prog Brain Res, 2014. **213**: p. 87-96.
11. Ryan, D.P. and L.J. Ptacek, *Episodic neurological channelopathies*. Neuron, 2010. **68**(2): p. 282-92.
12. Tiron, C., et al., *Further evidence of the association between LQT syndrome and epilepsy in a family with KCNQ1 pathogenic variant*. Seizure, 2015. **25**: p. 65-7.
13. Brugada, J., I. Gussak, and P. Brugada, *Short QT syndrome: a predictable story*. Cardiology, 2014. **128**(3): p. 231-3.
14. Brugada, R., et al., *Brugada syndrome*. Methodist Debakey Cardiovasc J, 2014. **10**(1): p. 25-8.
15. Sarquella-Brugada, G., et al., *Brugada syndrome: clinical and genetic findings*. Genet Med, 2016. **18**(1): p. 3-12.
16. Statland, J.M. and R.J. Barohn, *Muscle channelopathies: the nondystrophic myotonias and periodic paralyses*. Continuum (Minneapolis Minn), 2013. **19**(6 Muscle Disease): p. 1598-614.
17. Loudon, K.W. and A.C. Fry, *The renal channelopathies*. Ann Clin Biochem, 2014. **51**(Pt 4): p. 441-58.
18. Lorenzo, I.M., et al., *TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12611-6.
19. Villalonga, N., et al., *Immunomodulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in macrophages: molecular and biophysical consequences*. J Gen Physiol, 2010. **135**(2): p. 135-47.
20. Moreno, C., et al., *Modulation of voltage-dependent and inward rectifier potassium channels by 15-epi-lipoxin-A4 in activated murine macrophages: implications in innate immunity*. J Immunol, 2013. **191**(12): p. 6136-46.
21. Chandy, K.G., et al., *Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 369-85.
22. Claussnitzer, M., et al., *Leveraging cross-species transcription factor binding site patterns: from diabetes risk loci to disease mechanisms*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 343-58.
23. Huang, X. and L.Y. Jan, *Targeting potassium channels in cancer*. J Cell Biol, 2014. **206**(2): p. 151-62.
24. Yu, F.H., et al., *Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 387-95.
25. Gutman, G.A., et al., *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 473-508.
26. Frolov, R.V., et al., *Potassium channels in Drosophila: historical breakthroughs, significance, and perspectives*. J Neurogenet, 2012. **26**(3-4): p. 275-90.
27. MacKinnon, R., *Potassium channels*. FEBS Lett, 2003. **555**(1): p. 62-5.
28. Catterall, W.A., *Structure and function of voltage-sensitive ion channels*. Science, 1988. **242**(4875): p. 50-61.

29. Sansom, M.S., et al., *Potassium channels: structures, models, simulations*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1565**(2): p. 294-307.
30. Choe, S., *Potassium channel structures*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(2): p. 115-21.
31. Snyders, D.J., *Structure and function of cardiac potassium channels*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(2): p. 377-90.
32. Talwar, S. and J.W. Lynch, *Investigating ion channel conformational changes using voltage clamp fluorometry*. Neuropharmacology, 2015. **98**: p. 3-12.
33. Sansom, M.S., *Putting the parts together*. Curr Biol, 1999. **9**(19): p. R738-41.
34. Labro, A.J., et al., *Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues*. J Gen Physiol, 2008. **132**(6): p. 667-80.
35. Edwards, G. and A.H. Weston, *The role of potassium channels in excitable cells*. Diabetes Res Clin Pract, 1995. **28 Suppl**: p. S57-66.
36. Yellen, G., *The voltage-gated potassium channels and their relatives*. Nature, 2002. **419**(6902): p. 35-42.
37. Barros, F., P. Dominguez, and P. de la Pena, *Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 49.
38. Goodchild, S.J. and D. Fedida, *Contributions of intracellular ions to kv channel voltage sensor dynamics*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 114.
39. Capener, C.E., et al., *Ion channels: structural bioinformatics and modelling*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(20): p. 2425-33.
40. Aiyar, J., et al., *The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31013-6.
41. Sansom, M.S., *Ion channels: a first view of K<sup>+</sup> channels in atomic glory*. Curr Biol, 1998. **8**(13): p. R450-2.
42. Doyle, D.A., et al., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity*. Science, 1998. **280**(5360): p. 69-77.
43. Zhou, Y., et al., *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 43-8.
44. Zhou, Y. and R. MacKinnon, *The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates*. J Mol Biol, 2003. **333**(5): p. 965-75.
45. del Camino, D., et al., *Blocker protection in the pore of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel and its structural implications*. Nature, 2000. **403**(6767): p. 321-5.
46. Stuhmer, W., et al., *Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain*. EMBO J, 1989. **8**(11): p. 3235-44.
47. Bezanilla, F., *The voltage sensor in voltage-dependent ion channels*. Physiol Rev, 2000. **80**(2): p. 555-92.
48. Schwaiger, C.S., et al., *The conserved phenylalanine in the K<sup>+</sup> channel voltage-sensor domain creates a barrier with unidirectional effects*. Biophys J, 2013. **104**(1): p. 75-84.
49. Roux, B., *Dissecting the coupling between the voltage sensor and pore domains*. Neuron, 2006. **52**(4): p. 568-9.
50. Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff, *How far will you go to sense voltage?* Neuron, 2005. **48**(5): p. 719-25.
51. Vardanyan, V. and O. Pongs, *Coupling of voltage-sensors to the channel pore: a comparative view*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 145.
52. Bezanilla, F., *Voltage sensor movements*. J Gen Physiol, 2002. **120**(4): p. 465-73.
53. Bezanilla, F. and E. Perozo, *Structural biology. Force and voltage sensors in one structure*. Science, 2002. **298**(5598): p. 1562-3.
54. Lacroix, J.J., et al., *Moving gating charges through the gating pore in a Kv channel voltage sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(19): p. E1950-9.
55. Kalstrup, T. and R. Blunck, *Dynamics of internal pore opening in K(V) channels probed by a fluorescent unnatural amino acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8272-7.
56. Ashcroft, F.M. and F.M. Gribble, *Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K(ATP) channels*. J Diabetes Complications, 2000. **14**(4): p. 192-6.

57. Pongs, O. and J.R. Schwarz, *Ancillary subunits associated with voltage-dependent K<sup>+</sup> channels*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(2): p. 755-96.
58. Bett, G.C. and R.L. Rasmusson, *Modification of K<sup>+</sup> channel-drug interactions by ancillary subunits*. *J Physiol*, 2008. **586**(4): p. 929-50.
59. Yang, E.K., et al., *Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4839-44.
60. Birnbaum, S.G., et al., *Structure and function of Kv4-family transient potassium channels*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(3): p. 803-33.
61. Franqueza, L., et al., *Functional expression of an inactivating potassium channel (Kv4.3) in a mammalian cell line*. *Cardiovasc Res*, 1999. **41**(1): p. 212-9.
62. Wang, H., et al., *Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(1): p. 32-9.
63. Takimoto, K., E.K. Yang, and L. Conforti, *Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 26904-11.
64. Scannevin, R.H., et al., *Two N-terminal domains of Kv4 K(+) channels regulate binding to and modulation by KChIP1*. *Neuron*, 2004. **41**(4): p. 587-98.
65. Covarrubias, M., et al., *The neuronal Kv4 channel complex*. *Neurochem Res*, 2008. **33**(8): p. 1558-67.
66. Tang, Y.Q., et al., *The tetramerization domain potentiates Kv4 channel function by suppressing closed-state inactivation*. *Biophys J*, 2014. **107**(5): p. 1090-104.
67. Kong, W., et al., *Isolation and characterization of the human gene encoding Ito: further diversity by alternative mRNA splicing*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(6 Pt 2): p. H1963-70.
68. Abbott, G.W., *beta Subunits Functionally Differentiate Human Kv4.3 Potassium Channel Splice Variants*. *Front Physiol*, 2017. **8**: p. 66.
69. Po, S.S., et al., *Mechanism of alpha-adrenergic regulation of expressed hKv4.3 currents*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(6): p. H2518-27.
70. Rosati, B., et al., *Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle*. *J Physiol*, 2001. **533**(Pt 1): p. 119-25.
71. Takimoto, K., et al., *Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K<sup>+</sup> channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats*. *Circ Res*, 1997. **81**(4): p. 533-9.
72. Wickenden, A.D., et al., *Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1599-607.
73. Dixon, J.E., et al., *Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current*. *Circ Res*, 1996. **79**(4): p. 659-68.
74. Patel, S.P. and D.L. Campbell, *Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms*. *J Physiol*, 2005. **569**(Pt 1): p. 7-39.
75. Wang, K., *Modulation by clamping: Kv4 and KChIP interactions*. *Neurochem Res*, 2008. **33**(10): p. 1964-9.
76. Wang, S., et al., *Activation properties of Kv4.3 channels: time, voltage and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> dependence*. *J Physiol*, 2004. **557**(Pt 3): p. 705-17.
77. Bähring, R., et al., *Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels*. *J Physiol*, 2001. **535**(Pt 1): p. 65-81.
78. Beck, E.J., et al., *Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein*. *J Physiol*, 2002. **538**(Pt 3): p. 691-706.
79. Wang, S., et al., *Time- and voltage-dependent components of Kv4.3 inactivation*. *Biophys J*, 2005. **89**(5): p. 3026-41.
80. Rasmusson, R.L., et al., *Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels*. *Circ Res*, 1998. **82**(7): p. 739-50.
81. Jerng, H.H. and M. Covarrubias, *K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains*. *Biophys J*, 1997. **72**(1): p. 163-74.
82. Skerritt, M.R. and D.L. Campbell, *Role of S4 positively charged residues in the regulation of Kv4.3 inactivation and recovery*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(3): p. C906-14.

83. Jerng, H.H., M. Shahidullah, and M. Covarrubias, *Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore*. J Gen Physiol, 1999. **113**(5): p. 641-60.
84. Kaulin, Y.A., et al., *Mechanism of the modulation of Kv4:KChIP-1 channels by external K+*. Biophys J, 2008. **94**(4): p. 1241-51.
85. Bähring, R. and M. Covarrubias, *Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 3): p. 461-79.
86. Shahidullah, M. and M. Covarrubias, *The link between ion permeation and inactivation gating of Kv4 potassium channels*. Biophys J, 2003. **84**(2 Pt 1): p. 928-41.
87. Rhodes, K.J., et al., *KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain*. J Neurosci, 2004. **24**(36): p. 7903-15.
88. Holmqvist, M.H., et al., *Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 1035-40.
89. Zhou, W., et al., *Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K(+) channels*. Neuron, 2004. **41**(4): p. 573-86.
90. An, W.F., et al., *Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 553-6.
91. Schwenk, J., et al., *NMR analysis of KChIP4a reveals structural basis for control of surface expression of Kv4 channel complexes*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18937-46.
92. Pioletti, M., et al., *Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(11): p. 987-95.
93. Long, S.B., E.B. Campbell, and R. Mackinnon, *Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K+ channel*. Science, 2005. **309**(5736): p. 897-903.
94. Kim, L.A., et al., *Three-dimensional structure of I(to); Kv4.2-KChIP2 ion channels by electron microscopy at 21 Angstrom resolution*. Neuron, 2004. **41**(4): p. 513-9.
95. Kim, L.A., et al., *Ito channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K+ channel-interacting protein 2*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5549-54.
96. Ren, X., S.H. Shand, and K. Takimoto, *Effective association of Kv channel-interacting proteins with Kv4 channel is mediated with their unique core peptide*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43564-70.
97. Callsen, B., et al., *Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP interaction [corrected]*. J Physiol, 2005. **568**(Pt 2): p. 397-412.
98. Shibata, R., et al., *A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36445-54.
99. Tomaselli, G.F. and E. Marban, *Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(2): p. 270-83.
100. Jeyaraj, D., et al., *Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis*. Nature, 2012. **483**(7387): p. 96-9.
101. Liu, J., et al., *Kv4.3-Encoded Fast Transient Outward Current Is Presented in Kv4.2 Knockout Mouse Cardiomyocytes*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133274.
102. Decher, N., et al., *hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant*. Cardiovasc Res, 2001. **52**(2): p. 255-64.
103. Brugada, R., et al., *Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation*. N Engl J Med, 1997. **336**(13): p. 905-11.
104. Waldschmidt, L., V. Junkereit, and R. Bähring, *KChIP2 genotype dependence of transient outward current (Ito) properties in cardiomyocytes isolated from male and female mice*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0171213.
105. Decher, N., et al., *Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents*. J Physiol, 2004. **557**(Pt 3): p. 761-72.
106. Ohya, S., et al., *Molecular cloning and tissue distribution of an alternatively spliced variant of an A-type K+ channel alpha-subunit, Kv4.3 in the rat*. FEBS Lett, 1997. **420**(1): p. 47-53.
107. Ohya, S., et al., *Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K(+) channel-interacting protein 2*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(1): p. 96-102.



108. Kuo, H.C., et al., *A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia*. *Cell*, 2001. **107**(6): p. 801-13.
109. Deschenes, I., et al., *Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants: a component of native cardiac I(to)?* *Circulation*, 2002. **106**(4): p. 423-9.
110. Deschenes, I. and G.F. Tomaselli, *Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits*. *FEBS Lett*, 2002. **528**(1-3): p. 183-8.
111. Patel, S.P., et al., *Heterogeneous expression of KChIP2 isoforms in the ferret heart*. *J Physiol*, 2002. **539**(Pt 3): p. 649-56.
112. Patel, S.P., D.L. Campbell, and H.C. Strauss, *Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform*. *J Physiol*, 2002. **545**(Pt 1): p. 5-11.
113. Patel, S.P., et al., *Regulation of Kv4.3 voltage-dependent gating kinetics by KChIP2 isoforms*. *J Physiol*, 2004. **557**(Pt 1): p. 19-41.
114. Shinzato, A., et al., *Evaluation of Downstream Regulatory Element Antagonistic Modulator Gene in Human Multinodular Goiter*. *Med Sci Monit Basic Res*, 2015. **21**: p. 179-82.
115. Pruunsild, P. and T. Timmusk, *Subcellular localization and transcription regulatory potency of KCNIP/Calsenilin/DREAM/KChIP proteins in cultured primary cortical neurons do not provide support for their role in CRE-dependent gene expression*. *J Neurochem*, 2012. **123**(1): p. 29-43.
116. Kunjilwar, K., Y. Qian, and P.J. Pfaffinger, *Functional stoichiometry underlying KChIP regulation of Kv4.2 functional expression*. *J Neurochem*, 2013. **126**(4): p. 462-72.
117. Carrion, A.M., et al., *DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor*. *Nature*, 1999. **398**(6722): p. 80-4.
118. Mandel, G. and R.H. Goodman, *Cell signalling. DREAM on without calcium*. *Nature*, 1999. **398**(6722): p. 29-30.
119. Ledo, F., et al., *Ca<sup>2+</sup>-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM*. *EMBO J*, 2002. **21**(17): p. 4583-92.
120. Ledo, F., et al., *The DREAM-DRE interaction: key nucleotides and dominant negative mutants*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1498**(2-3): p. 162-8.
121. Osawa, M., et al., *Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(44): p. 41005-13.
122. Lilliehook, C., et al., *Altered Abeta formation and long-term potentiation in a calsenilin knock-out*. *J Neurosci*, 2003. **23**(27): p. 9097-106.
123. Rivas, M., et al., *Building the DREAM interactome*. *Sci China Life Sci*, 2011. **54**(8): p. 786-92.
124. Cheng, H.Y., et al., *DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation*. *Cell*, 2002. **108**(1): p. 31-43.
125. Rivera-Arconada, I., et al., *DREAM regulates BDNF-dependent spinal sensitization*. *Mol Pain*, 2010. **6**: p. 95.
126. Hu, H.J., et al., *The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity*. *Neuron*, 2006. **50**(1): p. 89-100.
127. Wu, L.J., et al., *DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) contributes to synaptic depression and contextual fear memory*. *Mol Brain*, 2010. **3**: p. 3.
128. Alexander, J.C., et al., *The role of calsenilin/DREAM/KChIP3 in contextual fear conditioning*. *Learn Mem*, 2009. **16**(3): p. 167-77.
129. Mellstrom, B., et al., *DREAM controls the on/off switch of specific activity-dependent transcription pathways*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(5): p. 877-87.
130. Savignac, M., et al., *Transcriptional repressor DREAM regulates T-lymphocyte proliferation and cytokine gene expression*. *EMBO J*, 2005. **24**(20): p. 3555-64.
131. Savignac, M., B. Mellstrom, and J.R. Naranjo, *Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes*. *Pflugers Arch*, 2007. **454**(4): p. 523-33.
132. Rivas, M., et al., *Redox signaling regulates transcriptional activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent repressor DREAM*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(7): p. 1237-43.
133. Jo, D.G., et al., *Pro-apoptotic function of calsenilin/DREAM/KChIP3*. *FASEB J*, 2001. **15**(3): p. 589-91.

134. Lilliehook, C., et al., *Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling*. Mol Cell Neurosci, 2002. **19**(4): p. 552-9.
135. Buxbaum, J.D., et al., *Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1177-81.
136. Venn, N., L.P. Haynes, and R.D. Burgoyne, *Specific effects of KChIP3/calsenilin/DREAM, but not KChIPs 1, 2 and 4, on calcium signalling and regulated secretion in PC12 cells*. Biochem J, 2008. **413**(1): p. 71-80.
137. Craig, T.A., et al., *The metal-binding properties of DREAM: evidence for calcium-mediated changes in DREAM structure*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10955-66.
138. Russo, C., et al., *Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease*. Nature, 2000. **405**(6786): p. 531-2.
139. Leissring, M.A., et al., *Calsenilin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8590-3.
140. Ruiz-Gomez, A., et al., *G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of downstream regulatory element antagonist modulator regulates membrane trafficking of Kv4.2 potassium channel*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 1205-15.
141. Kunjilwar, K., et al., *KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54542-51.
142. Osawa, M., et al., *Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> differentially regulate DNA binding and dimerization of DREAM*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 18008-14.
143. Iacovelli, L., et al., *Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 1-8.
144. Palczewska, M., et al., *Sumoylation regulates nuclear localization of repressor DREAM*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 1050-8.
145. Pak, M.D., et al., *mShal, a subfamily of A-type K<sup>+</sup> channel cloned from mammalian brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4386-90.
146. Nerbonne, J.M., *Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium*. J Physiol, 2000. **525 Pt 2**: p. 285-98.
147. Ravens, U. and E. Cerbai, *Role of potassium currents in cardiac arrhythmias*. Europace, 2008. **10**(10): p. 1133-7.
148. Oudit, G.Y., et al., *The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) in normal and diseased myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 851-72.
149. Brahmajothi, M.V., et al., *Distinct transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes*. J Gen Physiol, 1999. **113**(4): p. 581-600.
150. Liu, W.J., et al., *Co-expression of KCNE2 and KChIP2c modulates the electrophysiological properties of Kv4.2 current in COS-7 cells*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(6): p. 653-60.
151. Rosati, B., et al., *Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle*. J Physiol, 2003. **548**(Pt 3): p. 815-22.
152. Litovsky, S.H. and C. Antzelevitch, *Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium*. Circ Res, 1988. **62**(1): p. 116-26.
153. Furukawa, T., et al., *Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes*. Circ Res, 1990. **67**(5): p. 1287-91.
154. Fedida, D. and W.R. Giles, *Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle*. J Physiol, 1991. **442**: p. 191-209.
155. Wettwer, E., et al., *Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin*. Circ Res, 1994. **75**(3): p. 473-82.
156. Apkon, M. and J.M. Nerbonne, *Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(22): p. 8756-60.
157. Ravens, U., X.L. Wang, and E. Wettwer, *Alpha adrenoceptor stimulation reduces outward currents in rat ventricular myocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **250**(1): p. 364-70.
158. Fedida, D., Y. Shimoni, and W.R. Giles, *Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes*. J Physiol, 1990. **423**: p. 257-77.

159. Tohse, N., et al., *Inhibitory effect mediated by alpha 1-adrenoceptors on transient outward current in isolated rat ventricular cells*. Pflugers Arch, 1990. **415**(5): p. 575-81.
160. Homma, N., et al., *Both alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenergic receptor subtypes couple to the transient outward current (I<sub>To</sub>) in rat ventricular myocytes*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(6): p. 1113-20.
161. van der Heyden, M.A., T.J. Wijnhoven, and T. Opthof, *Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(3): p. 430-42.
162. Workman, A.J., et al., *Transient outward K<sup>+</sup> current reduction prolongs action potentials and promotes afterdepolarisations: a dynamic-clamp study in human and rabbit cardiac atrial myocytes*. J Physiol, 2012. **590**(17): p. 4289-305.
163. Maier, L.S. and D.M. Bers, *Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(8): p. 919-39.
164. Sergeant, G.P., et al., *Regulation of Kv4.3 currents by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(2): p. C304-13.
165. Colinas, O., et al., *Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1978-87.
166. El-Haou, S., et al., *Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes*. Circ Res, 2009. **104**(6): p. 758-69.
167. Song, M., et al., *Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31883-90.
168. Cerbai, E., et al., *Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 388-96.
169. Doronin, S.V., et al., *Angiotensin receptor type 1 forms a complex with the transient outward potassium channel Kv4.3 and regulates its gating properties and intracellular localization*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48231-7.
170. Opthof, T., et al., *Dispersion of refractoriness in normal and ischaemic canine ventricle: effects of sympathetic stimulation*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(11): p. 1954-60.
171. Nabauer, M. and S. Kaab, *Potassium channel down-regulation in heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 324-34.
172. Wickenden, A.D., et al., *The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 312-23.
173. Kaprielian, R., et al., *Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction*. J Physiol, 1999. **517** ( Pt 1): p. 229-45.
174. Kaab, S., et al., *Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density*. Circulation, 1998. **98**(14): p. 1383-93.
175. Lebeche, D., et al., *In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis*. Circulation, 2004. **110**(22): p. 3435-43.
176. Beuckelmann, D.J., M. Nabauer, and E. Erdmann, *Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. Circ Res, 1993. **73**(2): p. 379-85.
177. Nabauer, M., D.J. Beuckelmann, and E. Erdmann, *Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. Circ Res, 1993. **73**(2): p. 386-94.
178. He, Q., Y. Feng, and Y. Wang, *Transient outward potassium channel: a heart failure mediator*. Heart Fail Rev, 2015. **20**(3): p. 349-62.
179. Zhao, X.J., et al., *Effects of allitridum on the transient outward potassium current in rats with heart failure*. J Geriatr Cardiol, 2016. **13**(9): p. 783-788.
180. Nishiyama, A., et al., *Altered K(+) channel gene expression in diabetic rat ventricle: isoform switching between Kv4.2 and Kv1.4*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1800-7.
181. Rozanski, G.J. and Z. Xu, *A metabolic mechanism for cardiac K<sup>+</sup> channel remodelling*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(1-2): p. 132-7.

182. Sato, T., et al., *Type 2 diabetes induces subendocardium-predominant reduction in transient outward K<sup>+</sup> current with downregulation of Kv4.2 and KChIP2*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(7): p. H1054-65.
183. Huang, B., D. Qin, and N. El-Sherif, *Spatial alterations of Kv channels expression and K(+) currents in post-MI remodeled rat heart*. *Cardiovasc Res*, 2001. **52**(2): p. 246-54.
184. Brundel, B.J., et al., *Molecular adaptations in human atrial fibrillation: mechanisms of protein remodelling*. *Neth Heart J*, 2001. **9**(6): p. 235-239.
185. Grammer, J.B., et al., *Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000. **11**(6): p. 626-33.
186. You, T., et al., *Two novel Brugada syndrome-associated mutations increase KV4.3 membrane expression and function*. *Int J Mol Med*, 2015. **36**(1): p. 309-15.
187. Giudicessi, J.R., et al., *Transient outward current (I<sub>to</sub>) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome*. *Heart Rhythm*, 2011. **8**(7): p. 1024-32.
188. Malin, S.A. and J.M. Nerbonne, *Molecular heterogeneity of the voltage-gated fast transient outward K<sup>+</sup> current, I(A<sub>f</sub>), in mammalian neurons*. *J Neurosci*, 2001. **21**(20): p. 8004-14.
189. Hoffman, D.A., et al., *K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons*. *Nature*, 1997. **387**(6636): p. 869-75.
190. Thompson, S.H., *Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones*. *J Physiol*, 1977. **265**(2): p. 465-88.
191. Jerng, H.H. and P.J. Pfaffinger, *Modulatory mechanisms and multiple functions of somatodendritic A-type K (+) channel auxiliary subunits*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 82.
192. Kim, J., D.S. Wei, and D.A. Hoffman, *Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones*. *J Physiol*, 2005. **569**(Pt 1): p. 41-57.
193. Jerng, H.H., P.J. Pfaffinger, and M. Covarrubias, *Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels*. *Mol Cell Neurosci*, 2004. **27**(4): p. 343-69.
194. Bourdeau, M.L., et al., *KChIP1 modulation of Kv4.3-mediated A-type K(+) currents and repetitive firing in hippocampal interneurons*. *Neuroscience*, 2011. **176**: p. 173-87.
195. Serodio, P., C. Kentros, and B. Rudy, *Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials*. *J Neurophysiol*, 1994. **72**(4): p. 1516-29.
196. Maffie, J. and B. Rudy, *Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K<sup>+</sup> currents in neurons*. *J Physiol*, 2008. **586**(23): p. 5609-23.
197. Liss, B., et al., *Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription*. *EMBO J*, 2001. **20**(20): p. 5715-24.
198. Anderson, D., et al., *Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(3): p. 333-7.
199. Bourdeau, M.L., et al., *Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons*. *J Neurosci*, 2007. **27**(8): p. 1942-53.
200. Menegola, M., et al., *Dendritic A-type potassium channel subunit expression in CA1 hippocampal interneurons*. *Neuroscience*, 2008. **154**(3): p. 953-64.
201. Jerng, H.H., K. Kunjilwar, and P.J. Pfaffinger, *Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties*. *J Physiol*, 2005. **568**(Pt 3): p. 767-88.
202. Li, H.L., et al., *DPP10 is an inactivation modulatory protein of Kv4.3 and Kv1.4*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(5): p. C966-76.
203. Zagha, E., et al., *DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 18853-61.
204. Colinas, O., et al., *A role for DPPX modulating external TEA sensitivity of Kv4 channels*. *J Gen Physiol*, 2008. **131**(5): p. 455-71.
205. Van Hoorick, D., et al., *Differential modulation of Kv4 kinetics by KCHIP1 splice variants*. *Mol Cell Neurosci*, 2003. **24**(2): p. 357-66.
206. Burkhalter, A., et al., *Differential expression of I(A) channel subunits Kv4.2 and Kv4.3 in mouse visual cortical neurons and synapses*. *J Neurosci*, 2006. **26**(47): p. 12274-82.

207. Magee, J.C. and M. Carruth, *Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons*. J Neurophysiol, 1999. **82**(4): p. 1895-901.
208. Spruston, N., P. Jonas, and B. Sakmann, *Dendritic glutamate receptor channels in rat hippocampal CA3 and CA1 pyramidal neurons*. J Physiol, 1995. **482** ( Pt 2): p. 325-52.
209. Beck, H., et al., *Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells*. J Physiol, 1997. **498** ( Pt 1): p. 73-85.
210. Hong, Y.M., et al., *Reduced expression of calsenilin/DREAM/KChIP3 in the brains of kainic acid-induced seizure and epilepsy patients*. Neurosci Lett, 2003. **340**(1): p. 33-6.
211. Matsu-ura, T., et al., *Seizure-mediated neuronal activation induces DREAM gene expression in the mouse brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. **109**(1-2): p. 198-206.
212. Bowyer, S.M., et al., *Slow brain activity (ISA/DC) detected by MEG*. J Clin Neurophysiol, 2012. **29**(4): p. 320-6.
213. Roberds, S.L., et al., *Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1993. **4**(1): p. 68-80.
214. Tseng, G.N. and B.F. Hoffman, *Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes*. Circ Res, 1989. **64**(4): p. 633-47.
215. Martina, M., et al., *Functional and molecular differences between voltage-gated K<sup>+</sup> channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus*. J Neurosci, 1998. **18**(20): p. 8111-25.
216. Gonzalez, T., et al., *Effects of bupivacaine and a novel local anesthetic, IQB-9302, on human cardiac K<sup>+</sup> channels*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **296**(2): p. 573-83.
217. Solth, A., C.C. Siebrands, and P. Friederich, *Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 channels by bupivacaine and its modulation by the pore mutation Kv4.3V401I*. Anesthesiology, 2005. **103**(4): p. 796-804.
218. Friederich, P. and A. Solth, *Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes*. Anesthesiology, 2004. **101**(6): p. 1347-56.
219. Slawsky, M.T. and N.A. Castle, *K<sup>+</sup> channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **269**(1): p. 66-74.
220. Imaizumi, Y. and W.R. Giles, *Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle*. Am J Physiol, 1987. **253**(3 Pt 2): p. H704-8.
221. Hatano, N., et al., *Dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel antagonists and agonists block Kv4.2, Kv4.3 and Kv1.4 K<sup>+</sup> channels expressed in HEK293 cells*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(3): p. 533-44.
222. Bett, G.C., et al., *KChIP2b modulates the affinity and use-dependent block of Kv4.3 by nifedipine*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1167-77.
223. Moreno, I., et al., *Effects of irbesartan on cloned potassium channels involved in human cardiac repolarization*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(2): p. 862-73.
224. Macias, A., et al., *Celecoxib blocks cardiac Kv1.5, Kv4.3 and Kv7.1 (KCNQ1) channels: effects on cardiac action potentials*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(6): p. 984-92.
225. Huo, R., et al., *The potential role of Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in heart hypertrophy*. Channels (Austin), 2014. **8**(3): p. 203-9.
226. Kim, S.E., et al., *Open channel block of A-type, kv4.3, and delayed rectifier K<sup>+</sup> channels, Kv1.3 and Kv3.1, by sibutramine*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 753-62.
227. Boland, L.M., et al., *Inhibitory effects of polyunsaturated fatty acids on Kv4/KChIP potassium channels*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(5): p. C1003-14.
228. Holmqvist, M.H., et al., *Kinetic modulation of Kv4-mediated A-current by arachidonic acid is dependent on potassium channel interacting proteins*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4154-61.
229. Brahmajothi, M.V. and D.L. Campbell, *Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects*. Circ Res, 1999. **85**(7): p. 575-87.
230. Sanguinetti, M.C., et al., *Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels*. Mol Pharmacol, 1997. **51**(3): p. 491-8.
231. DeSimone, C.V., et al., *S3b amino acid substitutions and ancillary subunits alter the affinity of Heteropoda venatoria toxin 2 for Kv4.3*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(1): p. 125-33.

232. DeSimone, C.V., et al., *Heteropoda toxin 2 interaction with Kv4.3 and Kv4.1 reveals differences in gating modification*. Mol Pharmacol, 2011. **80**(2): p. 345-55.
233. Bougis, P.E. and M.F. Martin-Eauclaire, *Shal-type (Kv4.x) potassium channel pore blockers from scorpion venoms*. Sheng Li Xue Bao, 2015. **67**(3): p. 248-54.
234. Lundby, A., et al., *Effect of the I(to) activator NS5806 on cloned K(V)4 channels depends on the accessory protein KChIP2*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(8): p. 2028-44.
235. Calloe, K., et al., *Differential effects of the transient outward K(+) current activator NS5806 in the canine left ventricle*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(1): p. 191-200.
236. Gonzalez, W.G., K. Pham, and J. Miksovská, *Modulation of the voltage-gated potassium channel (Kv4.3) and the auxiliary protein (KChIP3) interactions by the current activator NS5806*. J Biol Chem, 2014. **289**(46): p. 32201-13.
237. Cheng, H., M.B. Cannell, and J.C. Hancox, *Differential responses of rabbit ventricular and atrial transient outward current (Ito) to the Ito modulator NS5806*. Physiol Rep, 2017. **5**(5).
238. Bowlby, M.R., et al., *Identification and characterization of small molecule modulators of KChIP/Kv4 function*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(22): p. 6112-9.
239. Zhao, T., et al., *Subcellular Clearance and Accumulation of Huntington Disease Protein: A Mini-Review*. Front Mol Neurosci, 2016. **9**: p. 27.
240. Raymond, L.A., et al., *Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function*. Neuroscience, 2011. **198**: p. 252-73.
241. Sathasivam, K., et al., *Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(6): p. 2366-70.
242. Waters, C.W., et al., *Huntington disease skeletal muscle is hyperexcitable owing to chloride and potassium channel dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9160-5.
243. She, P., et al., *Molecular characterization of skeletal muscle atrophy in the R6/2 mouse model of Huntington's disease*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(1): p. E49-61.
244. Aziz, N.A., et al., *Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in Huntington's disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1223-8.
245. Munoz-Sanjuan, I. and G.P. Bates, *The importance of integrating basic and clinical research toward the development of new therapies for Huntington disease*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 476-83.
246. Vonsattel, J.P., et al., *Neuropathological classification of Huntington's disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1985. **44**(6): p. 559-77.
247. Vonsattel, J.P. and M. DiFiglia, *Huntington disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(5): p. 369-84.
248. Cepeda, C., et al., *Genetic mouse models of Huntington's disease: focus on electrophysiological mechanisms*. ASN Neuro, 2010. **2**(2): p. e00033.
249. Bradford, J., et al., *Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22480-5.
250. Aylward, E.H., et al., *Longitudinal change in regional brain volumes in prodromal Huntington disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011. **82**(4): p. 405-10.
251. Walker, F.O., *Huntington's Disease*. Semin Neurol, 2007. **27**(2): p. 143-50.
252. Sassone, J., et al., *Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues*. Exp Neurol, 2009. **219**(2): p. 385-97.
253. Petersen, A., S. Hult, and D. Kirik, *Huntington's disease - new perspectives based on neuroendocrine changes in rodent models*. Neurodegener Dis, 2009. **6**(4): p. 154-64.
254. van der Burg, J.M., M. Bjorkqvist, and P. Brundin, *Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease*. Lancet Neurol, 2009. **8**(8): p. 765-74.
255. Saudou, F. and S. Humbert, *The Biology of Huntingtin*. Neuron, 2016. **89**(5): p. 910-26.
256. Abildtrup, M. and M. Shattock, *Cardiac Dysautonomia in Huntington's Disease*. J Huntingtons Dis, 2013. **2**(3): p. 251-61.
257. Mangiarini, L., et al., *Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice*. Cell, 1996. **87**(3): p. 493-506.
258. Zuhlke, C., et al., *Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)<sub>n</sub> repeat in the Huntington disease gene*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(12): p. 2063-7.

259. Blackstone, C., *Huntington's disease: from disease mechanisms to therapies*. Drug Discov Today, 2014. **19**(7): p. 949-50.
260. Kremer, B., et al., *A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats*. N Engl J Med, 1994. **330**(20): p. 1401-6.
261. Marques Sousa, C. and S. Humbert, *Huntingtin: here, there, everywhere!* J Huntingtons Dis, 2013. **2**(4): p. 395-403.
262. Ross, C.A., et al., *Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(4): p. 204-16.
263. Lee, J.M., et al., *CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion*. Neurology, 2012. **78**(10): p. 690-5.
264. Nopoulos, P.C., *Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum*. Dialogues Clin Neurosci, 2016. **18**(1): p. 91-8.
265. Read, J., et al., *Quality of life in Huntington's disease: a comparative study investigating the impact for those with pre-manifest and early manifest disease, and their partners*. J Huntingtons Dis, 2013. **2**(2): p. 159-75.
266. Seneca, S., et al., *Early onset Huntington disease: a neuronal degeneration syndrome*. Eur J Pediatr, 2004. **163**(12): p. 717-21.
267. Quarrell, O., et al., *The Prevalence of Juvenile Huntington's Disease: A Review of the Literature and Meta-Analysis*. PLoS Curr, 2012. **4**: p. e4f8606b742ef3.
268. Rigamonti, D., et al., *Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3*. J Neurosci, 2000. **20**(10): p. 3705-13.
269. Waelter, S., et al., *The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(17): p. 1807-17.
270. El-Daher, M.T., et al., *Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation*. EMBO J, 2015. **34**(17): p. 2255-71.
271. Elias, S., et al., *Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation*. Stem Cell Reports, 2014. **2**(4): p. 491-506.
272. Bates, G., *Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease*. Lancet, 2003. **361**(9369): p. 1642-4.
273. Arrasate, M., et al., *Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 805-10.
274. Reiner, A., et al., *R6/2 neurons with intranuclear inclusions survive for prolonged periods in the brains of chimeric mice*. J Comp Neurol, 2007. **505**(6): p. 603-29.
275. Petersen, A., et al., *Orexin loss in Huntington's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(1): p. 39-47.
276. Valor, L.M., *Transcription, epigenetics and ameliorative strategies in Huntington's Disease: a genome-wide perspective*. Mol Neurobiol, 2015. **51**(1): p. 406-23.
277. Shirasaki, D.I., et al., *Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain*. Neuron, 2012. **75**(1): p. 41-57.
278. Tong, X., et al., *Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice*. Nat Neurosci, 2014. **17**(5): p. 694-703.
279. Higashi, K., et al., *An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(3): p. C922-31.
280. Khakh, B.S. and M.V. Sofroniew, *Astrocytes and Huntington's disease*. ACS Chem Neurosci, 2014. **5**(7): p. 494-6.
281. Wilcock, D.M., M.P. Vitek, and C.A. Colton, *Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2009. **159**(3): p. 1055-69.
282. Ariano, M.A., et al., *Striatal potassium channel dysfunction in Huntington's disease transgenic mice*. J Neurophysiol, 2005. **93**(5): p. 2565-74.
283. Thompson, S.M., *IA in play*. Neuron, 2007. **54**(6): p. 850-2.
284. Azdad, K., et al., *Homeostatic plasticity of striatal neurons intrinsic excitability following dopamine depletion*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6908.
285. Tamargo, J., et al., *Pharmacology of cardiac potassium channels*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(1): p.9-33.

286. Halliday, M. and G.R. Mallucci, *Review: Modulating the unfolded protein response to prevent neurodegeneration and enhance memory*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015. **41**(4): p. 414-27.
287. Lee, J. and U. Ozcan, *Unfolded protein response signaling and metabolic diseases*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(3): p. 1203-11.
288. Fernandez-Fernandez, M.R., I. Ferrer, and J.J. Lucas, *Impaired ATF6alpha processing, decreased Rheb and neuronal cell cycle re-entry in Huntington's disease*. *Neurobiol Dis*, 2011. **41**(1): p. 23-32.
289. Lalik, P.H., et al., *Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(4 Pt 1): p. C803-9.
290. Abdalah, R., et al., *Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells*. *Neurosci Lett*, 2006. **405**(1-2): p. 68-73.
291. Yu, S.P. and G.A. Kerchner, *Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells*. *J Neurosci Res*, 1998. **52**(5): p. 612-7.
292. Gonzalez, T., et al., *Assembly with the Kvbeta1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(6): p. 1456-63.
293. David, M., et al., *Protein kinase C (PKC) activity regulates functional effects of Kvbeta1.3 subunit on KV1.5 channels: identification of a cardiac Kv1.5 channelosome*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(25): p. 21416-28.
294. Macias, A., et al., *PKC inhibition results in a Kv 1.5 + Kv beta1.3 pharmacology closer to Kv 1.5 channels*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(21): p. 4914-26.
295. Moreno, C., et al., *Marine n-3 PUFAs modulate IKs gating, channel expression, and location in membrane microdomains*. *Cardiovasc Res*, 2015. **105**(2): p. 223-32.
296. Neher, E. and B. Sakmann, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. *Nature*, 1976. **260**(5554): p. 799-802.
297. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. *Pflugers Arch*, 1981. **391**(2): p. 85-100.
298. Chae, Y.J., et al., *Block of Kv4.3 potassium channel by trifluoperazine independent of CaMKII*. *Neurosci Lett*, 2014. **578**: p. 159-64.
299. Franqueza, L., et al., *Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels*. *Circ Res*, 1997. **81**(6): p. 1053-64.
300. Arias, C., et al., *Kvbeta1.3 reduces the degree of stereoselective bupivacaine block of Kv1.5 channels*. *Anesthesiology*, 2007. **107**(4): p. 641-51.
301. Brady, P.A. and A. Terzic, *The sulfonylurea controversy: more questions from the heart*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **31**(5): p. 950-6.
302. Schotborgh, C.E. and A.A. Wilde, *Sulfonylurea derivatives in cardiovascular research and in cardiovascular patients*. *Cardiovasc Res*, 1997. **34**(1): p. 73-80.
303. Engbersen, R., et al., *Differential effects of sulfonylurea derivatives on vascular ATP-sensitive potassium channels*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **681**(1-3): p. 75-9.
304. Rainbow, R.D., et al., *Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in KATP channels*. *Biochem J*, 2004. **379**(Pt 1): p. 173-81.
305. Rosenblum, W.I., *ATP-sensitive potassium channels in the cerebral circulation*. *Stroke*, 2003. **34**(6): p. 1547-52.
306. Yao, X., et al., *Molecular cloning of a glibenclamide-sensitive, voltage-gated potassium channel expressed in rabbit kidney*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(11): p. 2525-33.
307. Hansen, A.M., et al., *Differential interactions of nateglinide and repaglinide on the human beta-cell sulphonylurea receptor 1*. *Diabetes*, 2002. **51**(9): p. 2789-95.
308. Yale, J.F., *Oral antihyperglycemic agents and renal disease: new agents, new concepts*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16 Suppl 1**: p. S7-10.
309. Quast, U., et al., *The impact of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 3**: p. S156-64.
310. He, Y.Y., et al., *Association of KCNJ11 and ABCC8 genetic polymorphisms with response to repaglinide in Chinese diabetic patients*. *Acta Pharmacol Sin*, 2008. **29**(8): p. 983-9.



311. Malaisse, W.J., *Pharmacology of the meglitinide analogs: new treatment options for type 2 diabetes mellitus*. *Treat Endocrinol*, 2003. **2**(6): p. 401-14.
312. Okada, M., et al., *Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 1): p. 87-97.
313. Hu, S., et al., *Pancreatic beta-cell K(ATP) channel activity and membrane-binding studies with nateglinide: A comparison with sulfonylureas and repaglinide*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **293**(2): p. 444-52.
314. Dabrowski, M., et al., *Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels*. *Diabetologia*, 2001. **44**(6): p. 747-56.
315. Wolfenbittel, B.H. and M.B. Graal, *New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus*. *Postgrad Med J*, 1996. **72**(853): p. 657-62.
316. Faivre, J.F., et al., *Characterisation of Kv4.3 in HEK293 cells: comparison with the rat ventricular transient outward potassium current*. *Cardiovasc Res*, 1999. **41**(1): p. 188-99.
317. Wu, J., et al., *KCNE2 modulation of Kv4.3 current and its potential role in fatal rhythm disorders*. *Heart Rhythm*, 2010. **7**(2): p. 199-205.
318. Wettwer, E., et al., *Transient outward current in human and rat ventricular myocytes*. *Cardiovasc Res*, 1993. **27**(9): p. 1662-9.
319. Yeola, S.W. and D.J. Snyders, *Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current*. *Cardiovasc Res*, 1997. **33**(3): p. 540-7.
320. Castle, N.A., *Bupivacaine inhibits the transient outward K<sup>+</sup> current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. **255**(3): p. 1038-46.
321. Sanchez-Chapula, J., et al., *Differences in outward currents between neonatal and adult rabbit ventricular cells*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H1184-94.
322. Abbott, G.W., *Regulation of human cardiac potassium channels by full-length KCNE3 and KCNE4*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 38412.
323. Shiina, Y., et al., *Fly DPP10 acts as a channel ancillary subunit and possesses peptidase activity*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26290.
324. Jeong, I., B.H. Choi, and S.J. Hahn, *Rosiglitazone inhibits Kv4.3 potassium channels by open-channel block and acceleration of closed-state inactivation*. *Br J Pharmacol*, 2011. **163**(3): p. 510-20.
325. Liang, P., et al., *Structural Insights into KChIP4a Modulation of Kv4.3 Inactivation*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(8): p. 4960-7.
326. Liang, P., et al., *Functional rescue of Kv4.3 channel tetramerization mutants by KChIP4a*. *Biophys J*, 2010. **98**(12): p. 2867-76.
327. Saha, K.B., et al., *Chlorpromazine versus atypical antipsychotic drugs for schizophrenia*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **4**: p. CD010631.
328. Nur, S. and C.E. Adams, *Chlorpromazine vs Reserpine for Schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 2016. **42**(3): p. 550-1.
329. Huf, G., et al., *Haloperidol plus promethazine for psychosis-induced aggression*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **11**: p. CD005146.
330. Sampford, J.R., et al., *Fluphenazine (oral) versus atypical antipsychotics for schizophrenia*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **7**: p. CD010832.
331. Mansilla, A., et al., *Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(6): p. E999-E1008.
332. Ames, J.B. and S. Lim, *Molecular structure and target recognition of neuronal calcium sensor proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(8): p. 1205-13.
333. Burgoyne, R.D. and L.P. Haynes, *Sense and specificity in neuronal calcium signalling*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(9): p. 1921-32.
334. Gomez, J.F., K. Cardona, and B. Trenor, *Lessons learned from multi-scale modeling of the failing heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2015. **89**(Pt B): p. 146-59.
335. Oparil, S. and R.E. Schmieder, *New approaches in the treatment of hypertension*. *Circ Res*, 2015. **116**(6): p. 1074-95.

336. Wagner, S., L.S. Maier, and D.M. Bers, *Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death*. *Circ Res*, 2015. **116**(12): p. 1956-70.
337. Antzelevitch, C., et al., *The role of late I<sub>Na</sub> in development of cardiac arrhythmias*. *Handb Exp Pharmacol*, 2014. **221**: p. 137-68.
338. Fernandez-Falgueras, A., et al., *Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances*. *Biology (Basel)*, 2017. **6**(1).
339. Chien, K.R., *Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 227-32.
340. Yang, K.C. and J.M. Nerbonne, *Mechanisms contributing to myocardial potassium channel diversity, regulation and remodeling*. *Trends Cardiovasc Med*, 2016. **26**(3): p. 209-18.
341. Gallego, M., et al., *Adrenergic regulation of cardiac ionic channels: role of membrane microdomains in the regulation of kv4 channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(2): p. 692-9.
342. Sah, R., et al., *Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I<sub>to</sub>)*. *J Physiol*, 2003. **546**(Pt 1): p. 5-18.
343. Niwa, N. and J.M. Nerbonne, *Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) expression and regulation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(1): p. 12-25.
344. Sun, X. and H.S. Wang, *Role of the transient outward current (I<sub>to</sub>) in shaping canine ventricular action potential—a dynamic clamp study*. *J Physiol*, 2005. **564**(Pt 2): p. 411-9.
345. Grubb, S., et al., *Preservation of cardiac function by prolonged action potentials in mice deficient of KChIP2*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **309**(3): p. H481-9.
346. Bohnen, M.S., et al., *Novel mechanism of transient outward potassium channel current regulation in the heart: implications for cardiac electrophysiology in health and disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(10): p. 1633-5.
347. Cordeiro, J.M., et al., *Physiological roles of the transient outward current I<sub>to</sub> in normal and diseased hearts*. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2016. **8**: p. 143-59.
348. Perrin, M.J., et al., *Evaluation of genes encoding for the transient outward current (I<sub>to</sub>) identifies the KCND2 gene as a cause of J-wave syndrome associated with sudden cardiac death*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014. **7**(6): p. 782-9.
349. Grubb, S., et al., *Loss of K<sup>+</sup> currents in heart failure is accentuated in KChIP2 deficient mice*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2014. **25**(8): p. 896-904.
350. Grubb, S., K. Calloe, and M.B. Thomsen, *Impact of KChIP2 on Cardiac Electrophysiology and the Progression of Heart Failure*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 118.
351. Speerschneider, T., et al., *Development of heart failure is independent of K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2 expression*. *J Physiol*, 2013. **591**(23): p. 5923-37.
352. Thomsen, M.B., et al., *Accessory subunit KChIP2 modulates the cardiac L-type calcium current*. *Circ Res*, 2009. **104**(12): p. 1382-9.
353. Fan, Z., et al., *Isosteviol prevents the prolongation of action potential in hypertrophied cardiomyocytes by regulating transient outward potassium and L-type calcium channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2017.
354. Zicha, S., et al., *Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts*. *J Physiol*, 2004. **561**(Pt 3): p. 735-48.
355. Rodrigues Junior, L.F., et al., *Chronic enalapril treatment increases transient outward potassium current in cardiomyocytes isolated from right ventricle of spontaneously hypertensive rats*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2017. **390**(3): p. 225-234.
356. Nassal, D.M., et al., *KChIP2 is a core transcriptional regulator of cardiac excitability*. *Elife*, 2017. **6**.
357. Ritzel, A., et al., *Acute heart failure in a patient with metabolic syndrome and diabetes mellitus: clinical evidence for direct positive influence of antidiabetic therapy on left ventricular function*. *Congest Heart Fail*, 2009. **15**(3): p. 148-50.
358. Huang, Y., et al., *Comparative cardiovascular safety of insulin secretagogues following hospitalization for ischemic heart disease among type 2 diabetes patients: a cohort study*. *J Diabetes Complications*, 2015. **29**(2): p. 196-202.

359. DiFiglia, M., et al., *Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain*. Science, 1997. **277**(5334): p. 1990-3.
360. Gutekunst, C.A., et al., *Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology*. J Neurosci, 1999. **19**(7): p. 2522-34.
361. Mehler, M.F. and S. Gokhan, *Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat*. Trends Neurosci, 2000. **23**(12): p. 599-605.
362. Ross, C.A. and S.J. Tabrizi, *Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment*. Lancet Neurol, 2011. **10**(1): p. 83-98.
363. Duff, K., et al., *"Frontal" behaviors before the diagnosis of Huntington's disease and their relationship to markers of disease progression: evidence of early lack of awareness*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2010. **22**(2): p. 196-207.
364. Beglinger, L.J., et al., *Obsessive and compulsive symptoms in prediagnosed Huntington's disease*. J Clin Psychiatry, 2008. **69**(11): p. 1758-65.
365. Biglan, K.M., et al., *Motor abnormalities in premanifest persons with Huntington's disease: the PREDICT-HD study*. Mov Disord, 2009. **24**(12): p. 1763-72.
366. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
367. Park, S.W. and U. Ozcan, *Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(3): p. 351-73.
368. Hetz, C. and B. Mollereau, *Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(4): p. 233-49.
369. Fonseca, S.G., et al., *Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(6): p. 763-70.
370. Kaufman, R.J., et al., *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 411-21.
371. Chaudhari, N., et al., *A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 213.
372. Manoharan, S., et al., *The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 8590578.
373. Ellgaard, L. and A. Helenius, *Quality control in the endoplasmic reticulum*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(3): p. 181-91.
374. Bernales, S., K.L. McDonald, and P. Walter, *Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response*. PLoS Biol, 2006. **4**(12): p. e423.
375. Chakrabarti, A., A.W. Chen, and J.D. Varner, *A review of the mammalian unfolded protein response*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(12): p. 2777-93.
376. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
377. Wu, J., et al., *ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress*. Dev Cell, 2007. **13**(3): p. 351-64.
378. Harding, H.P., et al., *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 897-904.
379. Novoa, I., et al., *Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression*. EMBO J, 2003. **22**(5): p. 1180-7.
380. Chang, R.C., et al., *Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease*. Neuroreport, 2002. **13**(18): p. 2429-32.
381. Ye, J., et al., *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1355-64.
382. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 99-111.

383. Shen, J. and R. Prywes, *Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43046-51.
384. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
385. Okada, T., et al., *A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31024-32.
386. Pham, K., et al., *Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> modulate conformational dynamics and stability of downstream regulatory element antagonist modulator*. Protein Sci, 2015. **24**(5): p. 741-51.
387. Wang, K. and Y. Wang, *Negative modulation of NMDA receptor channel function by DREAM/calsenilin/KChIP3 provides neuroprotection?* Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 39.
388. Moreno, J.A., et al., *Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice*. Sci Transl Med, 2013. **5**(206): p. 206ra138.
389. Ma, T., et al., *Suppression of eIF2alpha kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits*. Nat Neurosci, 2013. **16**(9): p. 1299-305.
390. Vidal, R.L. and C. Hetz, *Crosstalk between the UPR and autophagy pathway contributes to handling cellular stress in neurodegenerative disease*. Autophagy, 2012. **8**(6): p. 970-2.
391. Luthi-Carter, R., et al., *Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(9): p. 1259-71.
392. Hodges, A., et al., *Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 965-77.
393. Raymond, L.A., *Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **483**(4): p. 1051-1062.
394. De Mario, A., et al., *Calcium Handling by Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in a Cell Model of Huntington's Disease*. PLoS Curr, 2016. **8**.
395. Naranjo, J.R., et al., *Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease*. J Clin Invest, 2016. **126**(2): p. 627-38.
396. Yamamoto, K., et al., *Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1*. Dev Cell, 2007. **13**(3): p. 365-76.
397. Hunt, M.J. and A.J. Morton, *Atypical diabetes associated with inclusion formation in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is not improved by treatment with hypoglycaemic agents*. Exp Brain Res, 2005. **166**(2): p. 220-9.

## **7. ANEXO 1: PUBLICACIONES**

## 7.1. PUBLICACIONES ORIGINALES.

**Protein kinase C (PKC) activity regulates functional effects of  $K_v\beta 1.3$  subunit on  $K_v 1.5$  channels: identification of a cardiac  $K_v 1.5$  channelosome.**

David M., Macías Á., Moreno C., **Prieto Á.**, Martínez-Mármol R., Vicente R., González T., Felipe A., Tamkun M.M., Valenzuela C.

Abstract:  $K_v 1.5$  channels are the primary channels contributing to the ultrarapid outward potassium current ( $I_{Kur}$ ). The regulatory  $K_v\beta 1.3$  subunit converts  $K_v 1.5$  channels from delayed rectifiers with a modest degree of slow inactivation to channels with both fast and slow inactivation components. Previous studies have shown that inhibition of PKC with calphostin C abolishes the fast inactivation induced by  $K_v\beta 1.3$ . In this study, we investigated the mechanisms underlying this phenomenon using electrophysiological, biochemical, and confocal microscopy approaches. To achieve this, we used HEK293 cells (which lack  $K_v\beta$  subunits) transiently cotransfected with  $K_v 1.5 + K_v\beta 1.3$  and also rat ventricular and atrial tissue to study native  $\alpha$ - $\beta$  subunit interactions. Immunocytochemistry assays demonstrated that these channel subunits

colocalize in control conditions and after calphostin C treatment. Moreover, coimmunoprecipitation studies showed that  $K_v 1.5$  and  $K_v\beta 1.3$  remain associated after PKC inhibition. After knocking down all PKC isoforms by siRNA or inhibiting PKC with calphostin C,  $K_v\beta 1.3$ -induced fast inactivation at +60 mV was abolished. However, depolarization to +100 mV revealed  $K_v\beta 1.3$ -induced inactivation, indicating that PKC inhibition causes a dramatic positive shift of the inactivation curve. Our results demonstrate that calphostin C-mediated abolishment of fast inactivation is not due to the dissociation of  $K_v 1.5$  and  $K_v\beta 1.3$ . Finally, immunoprecipitation and immunocytochemistry experiments revealed an association between  $K_v 1.5$ ,  $K_v\beta 1.3$ , the receptor for activated C kinase (RACK1), PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, and PKC $\theta$  in HEK293 cells. A very similar  $K_v 1.5$  channelosome was found in rat ventricular tissue but not in atrial tissue. **J Biol Chem.** 2012 Jun 15; 287(25):21416-28.

**Functional assembly of K<sub>V</sub>7.1/K<sub>V</sub>7.5 channels with emerging properties on vascular muscle physiology.**

Oliveras A., Roura-Ferrer M., Solé L., de la Cruz A., **Prieto A.**, Etxebarria A., Manils J., Morales-Cano D., Condom E., Soler C., Cogolludo A., Valenzuela C., Villarroel A., Comes N., Felipe A.

Abstract: Objective: Voltage-dependent K<sup>(+)</sup> (K<sub>V</sub>) channels from the K<sub>V</sub>7 family are expressed in blood vessels and contribute to cardiovascular physiology. Although K<sub>V</sub>7 channel blockers trigger muscle contractions, K<sub>V</sub>7 activators act as vasorelaxants. K<sub>V</sub>7.1 and K<sub>V</sub>7.5 are expressed in many vessels. K<sub>V</sub>7.1 is under intense investigation because K<sub>V</sub>7.1 blockers fail to modulate smooth muscle reactivity. In this study, we analyzed whether K<sub>V</sub>7.1 and K<sub>V</sub>7.5 may form functional heterotetrameric channels increasing the channel diversity in vascular smooth muscles. Approach and results: K<sub>V</sub>7.1 and K<sub>V</sub>7.5 currents elicited in arterial myocytes, oocyte, and mammalian expression systems suggest the formation of heterotetrameric complexes. K<sub>V</sub>7.1/K<sub>V</sub>7.5 heteromers, exhibiting different pharmacological characteristics, participate in the arterial tone. K<sub>V</sub>7.1/K<sub>V</sub>7.5 associations were confirmed by coimmunoprecipitation, fluorescence resonance energy transfer, and fluorescence recovery after photobleaching experiments. K<sub>V</sub>7.1/K<sub>V</sub>7.5 heterotetramers were highly retained at the endoplasmic reticulum. Studies in HEK-293 cells, heart, brain, and smooth and skeletal muscles demonstrated that the predominant presence of K<sub>V</sub>7.5 stimulates release of K<sub>V</sub>7.1/K<sub>V</sub>7.5 oligomers out of lipid raft microdomains. Electrophysiological studies supported that KCNE1 and KCNE3 regulatory subunits further increased the channel diversity. Finally, the analysis of rat isolated myocytes and human blood vessels demonstrated that K<sub>V</sub>7.1 and K<sub>V</sub>7.5 exhibited a differential expression, which may lead to channel diversity. Conclusions: K<sub>V</sub>7.1 and K<sub>V</sub>7.5 form heterotetrameric channels increasing the diversity of structures which fine-tune blood vessel reactivity. Because the lipid raft localization of ion channels is crucial for cardiovascular physiology, K<sub>V</sub>7.1/K<sub>V</sub>7.5 heteromers provide efficient spatial and temporal regulation of smooth muscle function. Our results shed light on the debate about the contribution of K<sub>V</sub>7 channels to vasoconstriction and hypertension. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2014 Jul; 34(7):1522-30.

**PKC inhibition results in a  $K_V$  1.5 +  $K_V$   $\beta$ 1.3 pharmacology closer to  $K_V$  1.5 channels.**

Macías A., de la Cruz A., **Prieto A.**, Peraza D.A., Tamkun M.M., González T., Valenzuela C.

Abstract: Background and purpose: The  $K_V$   $\beta$ 1.3 subunit modifies the gating and pharmacology of  $K_V$  1.5 channels in a PKC-dependent manner, decreasing channel sensitivity to bupivacaine- and quinidine-mediated blockade. Cardiac  $K_V$  1.5 channels associate with receptor for activated C kinase 1 (RACK1), the  $K_V$   $\beta$ 1.3 subunit and different PKC isoforms, resulting in the formation of a functional channelosome. The aim of the present study was to investigate the effects of PKC inhibition on bupivacaine and quinidine block of  $K_V$  1.5 +  $K_V$   $\beta$ 1.3 channels. Experimental approach: HEK293 cells were transfected with  $K_V$  1.5 +  $K_V$   $\beta$ 1.3 channels, and currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. PKC inhibition was achieved by incubating the cells with either calphostin C or bisindolylmaleimide II and the effects of bupivacaine and quinidine were analysed. Key results: The voltage-dependent inactivation of  $K_V$  1.5 +  $K_V$   $\beta$ 1.3 channels and their pharmacological behaviour after PKC inhibition with calphostin C were similar to those displayed by  $K_V$  1.5 channels alone. Indeed, the IC50 values for bupivacaine were similar in cells whose PKC was inhibited with calphostin C or bisindolylmaleimide II. Similar results were also observed in the presence of quinidine. Conclusions and implications: The finding that the voltage-dependence of inactivation and the pharmacology of  $K_V$  1.5 +  $K_V$   $\beta$ 1.3 channels after PKC inhibition resembled that observed in  $K_V$  1.5 channels suggests that both processes are dependent on PKC-mediated phosphorylation. These results may have clinical relevance in diseases that are characterized by alterations in kinase activity. **Br J Pharmacol.** 2014 Nov; 171(21):4914-26.

**Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease.**

Naranjo J.R., Zhang H., Villar D., González P., Dopazo X.M., Morón-Oset J., Higuera E., Oliveros J.C., Arrabal M.D., **Prieto A.**, Cercós P., González T., De la Cruz A., Casado-Vela J., Rábano A., Valenzuela C., Gutierrez-Rodriguez M., Li J.Y., Mellström B.

Abstract: Deregulated protein and  $Ca^{2+}$  homeostasis underlie synaptic dysfunction and neurodegeneration in Huntington disease (HD); however, the factors that disrupt homeostasis are not fully understood. Here, we determined that expression of downstream regulatory element antagonist modulator (DREAM), a multifunctional  $Ca^{2+}$ -binding protein, is reduced in murine in vivo and in vitro HD models and in HD patients. DREAM downregulation was observed early after birth and was associated with endogenous neuroprotection. In the R6/2 mouse HD model, induced DREAM haplodeficiency or blockade



of DREAM activity by chronic administration of the drug repaglinide delayed onset of motor dysfunction, reduced striatal atrophy, and prolonged life span. DREAM-related neuroprotection was linked to an interaction between DREAM and the unfolded protein response (UPR) sensor activating transcription factor 6 (ATF6). Repaglinide blocked this interaction and enhanced ATF6 processing and nuclear accumulation of transcriptionally active ATF6, improving prosurvival UPR function in striatal neurons. Together, our results identify a role for DREAM silencing in the activation of ATF6 signaling, which promotes early neuroprotection in HD. **J Clin Invest.** 2016 Feb; 126(2):627-38.

## 7.2. REVISIONES

### **Stereoselective interactions between local anesthetics and ion channels.**

Valenzuela C., Moreno C., de la Cruz A., Macías Á., **Prieto Á.**, González T.

Abstract: Local anesthetics are useful probes of ion channel function and structure. Stereoselective interactions are especially interesting because they can reveal three-dimensional relationships between drugs and channels with otherwise identical biophysical and physicochemical properties. Furthermore, stereoselectivity suggests direct and specific receptor-mediated action, and identification of such stereospecific interactions may have important clinical consequences. The fact that drug targets are able to discriminate between the enantiomers present in a racemic drug is the consequence of the ordered asymmetric macromolecular units that form living cells. However, almost 25% of the drugs used in the clinical practice are racemic mixtures, and their individual enantiomers frequently differ in both their pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles. Moreover, their effects can be similar to or different from the pharmacological effect of the drug and may contribute to the undesired effects of the drug. In other cases, the pharmacological effects induced by the two enantiomers on the molecular target are opposite. In the present manuscript, we will review the stereoselective effects of bupivacaine-like local anesthetics on cardiac sodium and potassium channels. **Chirality.** 2012 Nov;24(11):944-50.

**Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiac Ion Channels.**

Moreno C., Macías A., **Prieto A.**, de la Cruz A., González T., Valenzuela C.

Abstract: Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been reported to exhibit antiarrhythmic properties, and these effects have been attributed to their capability to modulate ion channels. In the present review, we will focus on the effects of PUFAs on a cardiac sodium channel (Na<sub>v</sub>1.5) and two potassium channels involved in cardiac atrial and ventricular repolarization (K<sub>v</sub>) (K<sub>v</sub>1.5 and K<sub>v</sub>11.1). n-3 PUFAs of marine (docosahexaenoic, DHA and eicosapentaenoic acid, EPA) and plant origin (alpha-linolenic acid, ALA) block K<sub>v</sub>1.5 and K<sub>v</sub>11.1 channels at physiological concentrations. Moreover, DHA and EPA decrease the expression levels of K<sub>v</sub>1.5, whereas ALA does not. DHA and EPA also decrease the magnitude of the currents elicited by the activation of Na<sub>v</sub>1.5 and calcium channels. These effects on sodium and calcium channels should theoretically shorten the cardiac action potential duration (APD), whereas the blocking actions of n-3 PUFAs on K<sub>v</sub> channels would be expected to produce a lengthening of cardiac action potential. Indeed, the effects of n-3 PUFAs on the cardiac APD and, therefore, on cardiac arrhythmias vary depending on the method of application, the animal model, and the underlying cardiac pathology. **Front Physiol.** 2012 Jul 9; 3:245.

**Polyunsaturated Fatty acids modify the gating of K<sub>v</sub> channels.**

Moreno C., Macias A., **Prieto A.**, De La Cruz A., Valenzuela C.

Abstract: Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been reported to exhibit antiarrhythmic properties, which are attributed to their capability to modulate ion channels. This PUFAs ability has been reported to be due to their effects on the gating properties of ion channels. In the present review, we will focus on the role of PUFAs on the gating of two K<sub>v</sub> channels, K<sub>v</sub>1.5 and K<sub>v</sub>11.1. K<sub>v</sub>1.5 channels are blocked by n-3 PUFAs of marine [docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid] and plant origin (alpha-linolenic acid, ALA) at physiological concentrations. The blockade of K<sub>v</sub>1.5 channels by PUFAs steeply increased in the range of membrane potentials coinciding with those of K<sub>v</sub>1.5 channel activation, suggesting that PUFAs-channel binding may derive a significant fraction of its voltage sensitivity through the coupling to channel gating. A similar shift in the activation voltage was noted for the effects of n-6 arachidonic acid (AA) and DHA on K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2, and K<sub>v</sub>11.1 channels. PUFAs-K<sub>v</sub>1.5 channel interaction is time-dependent, producing a fast decay of the current upon depolarization. Thus, K<sub>v</sub>1.5 channel opening is a prerequisite for the PUFA-channel interaction. Similar to the K<sub>v</sub>1.5 channels, the blockade of K<sub>v</sub>11.1 channels by AA and DHA steeply increased in the range of embrane potentials that coincided with the

range of  $K_V11.1$  channel activation, suggesting that the PUFAs- $K_V$  channel interactions are also coupled to channel gating. Furthermore, AA regulates the inactivation process in other  $K_V$  channels, introducing a fast voltage-dependent inactivation in non-inactivating  $K_V$  channels. These results have been explained within the framework that AA closes voltage-dependent potassium channels by inducing conformational changes in the selectivity filter, suggesting that  $K_V$  channel gating is lipid dependent. **Front Pharmacol.** 2012 Sep 10; 3: 163.

### 7.3. PUBLICACIONES EN PREPARACIÓN

#### **Protein kinase C inhibition reduces the slow $K_V1.5$ recycling Rab11-mediated.**

A.Macías, A. de la Cruz, **A. Prieto**, T. González, C. Valenzuela.

Abstract: The activation of voltage gated potassium channels  $K_V1.5$  generates the  $I_{kur}$  current with slow inactivation. The regulatory  $K_V\beta1.3$  subunit converts  $K_V1.5$  channels from delayed rectifiers with a modest degree of slow inactivation to channels with both fast and slow inactivation components in a protein kinase C (PKC)-dependent manner. Previous studies have shown that inhibition of PKC not only abolishes the fast inactivation induced by  $K_V\beta1.3$ , but also decreases the magnitude of the current of  $K_V1.5$ - $K_V\beta1.3$  channels. In this study we investigated the mechanisms underlying this last phenomenon using electrophysiological, biochemical, live cell imaging and confocal microscopy approaches. The PKC inhibition by calphostin C  $3\mu\text{M}$  for 2 h. results in a decrease of  $32.6\pm 7.1\%$  of the number of channels in the cell surface due to an increase of them in the inner part of the cell at the end of the treatment. Live cells imaging approaches suggest that after this treatment the mobility of the  $K_V1.5$ - $K_V\beta1.3$  channels is completely abolished and this generates an accumulation of the channels into the cells because the channels are able to go in but not to go recycling to the plasma membrane. However, the electrophysiological experiments using Rab11CA increase the magnitude of the current with a similar degree of inactivation similar to that previously described. These results suggest that the slow trafficking regulation of  $K_V1.5$ - $K_V\beta1.3$  channels is phosphorylation dependent, and along with its described effect in their pharmacology could results clinically relevant mainly in the diseases characterized by alterations in kinase activity.