

Università Degli Studi di Milano  
Facoltà Di Medicina e Chirurgia  
Dottorato di Ricerca in Fisiologia Umana  
Ciclo XXXIV°



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

***Ricerca di mutazioni in proteine associate ai canali HCN in pazienti affetti da disturbi del ritmo cardiaco ed epilessia idiopatica***

Dottorando: Dottor Anselmo Simone

Matricola: R08185

Tutor: Prof. Mirko Baruscotti

Dipartimento di scienze biomolecolari e biotecnologie

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

**Anno Accademico 2010-2011**

## INDICE:

|                                                                                                                   |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| INTRODUZIONE.....                                                                                                 | p. 4  |
| L'EPILESSIA .....                                                                                                 | p. 6  |
| Classificazione.....                                                                                              | p. 7  |
| Canali Ionici ed Epilessia.....                                                                                   | p. 10 |
| DISTURBI DEL RITMO CARDIACO.....                                                                                  | p. 15 |
| L'attività autoritmica del cuore.....                                                                             | p. 15 |
| Tachicardia sinusale.....                                                                                         | p. 20 |
| Fibrillazione atriale.....                                                                                        | p. 21 |
| Sindrome del QT lungo.....                                                                                        | p. 23 |
| Sindrome del QT corto (SQTS).....                                                                                 | p. 24 |
| Bradicardia sinusale.....                                                                                         | p. 24 |
| Sindrome di Brugada.....                                                                                          | p. 25 |
| I CANALI HCN.....                                                                                                 | p.26  |
| La corrente $I_h$ .....                                                                                           | p. 26 |
| Proprietà molecolari dei canali HCN.....                                                                          | p. 29 |
| Modulazione della $I_h$ .....                                                                                     | p. 32 |
| Espressione fisiologica dei canali HCN.....                                                                       | p. 36 |
| Ruolo delle correnti condotte dai canali HCN nell'eccitabilità cellulare.....                                     | p. 38 |
| Contributo della corrente $I_h$ alla generazione del VR.....                                                      | p. 38 |
| Contributo della corrente $I_f$ alla ritmogenesi.....                                                             | p. 41 |
| Canali HCN ed epilessia.....                                                                                      | p. 43 |
| Canali HCN e disturbi del ritmo cardiaco.....                                                                     | p. 45 |
| INTERATTORI DEGLI HCN.....                                                                                        | p. 48 |
| MiRPs.....                                                                                                        | p. 49 |
| Filamine.....                                                                                                     | p. 52 |
| Caveoline.....                                                                                                    | p. 56 |
| Le caveolae .....                                                                                                 | p. 60 |
| Caveolinopatie.....                                                                                               | p. 61 |
| Caveolina-3 e aritmie.....                                                                                        | p. 62 |
| Caveolina 3 e canali HCN.....                                                                                     | p. 63 |
| SCOPO DEL LAVORO.....                                                                                             | p. 65 |
| MATERIALI E METODI.....                                                                                           | p. 66 |
| Estrazione del materiale genetico.....                                                                            | p. 67 |
| Quantificazione del DNA.....                                                                                      | p. 68 |
| Polymerase Chain Reaction (PCR).....                                                                              | p. 69 |
| Valutazione qualitativo-quantitativa della reazione di PCR.....                                                   | p. 73 |
| Analisi dei frammenti amplificati.....                                                                            | p. 74 |
| SSCP.....                                                                                                         | p. 75 |
| DHPLC.....                                                                                                        | p. 77 |
| Purificazione.....                                                                                                | p. 80 |
| Sequenziamento.....                                                                                               | p. 81 |
| Creazione del plasmide recante la mutazione C233T (T78M).....                                                     | p. 81 |
| Trasformazione batterica.....                                                                                     | p. 83 |
| Selezione del clone batterico contenente il DNA plasmidico ricombinante corretto (cracking) e sua espansione..... | p. 86 |
| Estrazione del DNA plasmidico.....                                                                                | p. 85 |
| Trasfezione.....                                                                                                  | p. 85 |

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Immunofluorescenza.....  | p. 86  |
| Elettrofisiologia.....   | p. 89  |
| RISULTATI.....           | p. 91  |
| Screening di hCAV3.....  | p. 91  |
| Screening di hMiRP1..... | p. 94  |
| Screening di hFLNA.....  | p. 96  |
| Statistica.....          | p. 97  |
| Elettrofisiologia.....   | p. 100 |
| DISCUSSIONE.....         | p. 102 |
| BIBLIOGRAFIA.....        | p. 107 |

# INTRODUZIONE

Il costante progresso nella comprensione delle funzioni e dei meccanismi molecolari alla base dei processi fisiologici di tipo elettrico, sta aprendo nuove strade per l'unificazione interpretativa di aspetti patologici caratteristici di distretti assai eterogenei, come nel caso dell'epilessia in ambito neurologico e dei disturbi del ritmo in quello cardiologico. In questo senso, si sono registrati notevoli sviluppi nell'ambito degli studi sui canali ionici, proteine transmembrana deputate al conferimento dell'eccitabilità cellulare sia neurale che muscolare. Tutti gli organismi cellulari, ed anche l'uomo, si servono dei canali ionici, posti sulle membrane plasmatiche, per condurre correnti ioniche ( Na, K, Ca e Cl) uscenti ed entranti e quindi generare differenze di potenziale e potenziali d'azione capaci di sostenerne l'eccitabilità .

In questo modo è possibile il controllo di processi cruciali per la vita, quali la trasmissione nervosa, la trasduzione sensoriale, la contrazione muscolare, la plasticità sinaptica e i processi di apprendimento e memoria. Molte malattie sono associate a disfunzioni genetiche o acquisite di questi canali, definite canalopatie. Esempi di canalopatie sono stati riscontrati in ambito neuromuscolare. La paralisi periodica diskaliemica, varie sindromi miotoniche non distrofiche, l'ipertermia maligna, alcune miopatie ed aritmie sono entità genetiche ben descritte (Rojas *et Al.*, 1991). Sono state successivamente identificate patologie neuronali. La neuromiotonia, le atassie episodiche, un numero crescente di sindromi epilettiche e l'emicrania emiplegica familiare fanno parte di questo gruppo (Ophoff *et Al.*, 1996). In numerose malattie neurologiche infine, in particolare in quelle autoimmuni e neurodegenerative, è noto un ruolo fisiopatologico di alcuni canali ionici che potrebbero in futuro diventare bersagli terapeutici. Le canalopatie rappresentano inoltre un modello di studio inedito del funzionamento normale e patologico del sistema nervoso e muscolare, come dimostrato da numerose nuove pubblicazioni sull'argomento.

La maggioranza di queste malattie deriva quindi da mutazioni nei geni che codificano per canali ionici. Queste mutazioni sono state utili per chiarire i ruoli fisiologici dei canali ionici e sono state fondamentali nel definire i domini funzionalmente importanti di queste proteine. La massa di studi sulle relazioni esistenti tra struttura e funzione nei canali voltaggio-dipendenti, per esempio, è stata di grande aiuto nel capire come le mutazioni producano il fenotipo clinico.

Molte canalopatie sono geneticamente eterogenee e lo stesso fenotipo clinico può essere causato da mutazioni in geni differenti. Per esempio, mutazioni in differenti geni (Ackerman, 2005) danno origine alla sindrome del QT lungo, una rara malattia cardiaca che può causare morte improvvisa. Viceversa,

mutazioni differenti nello stesso gene possono produrre fenotipi clinicamente differenti: l'atassia episodica di tipo-2, l'emigrania emiplegica familiare e l'atassia spinocerebellare di tipo-6, tutte derivano da mutazioni nella stessa subunità del canale del calcio (Hans *et Al.*, 1999 ).

Un'ulteriore ordine di complessità deriva dal fatto che spesso le subunità alfa, che formano il poro, sono associate ad altre strutture dette subunità accessorie e regolatorie, che controllano il grado di espressione e di funzionalità del canale. Inoltre alcuni secondi messaggeri attivati da specifici recettori di membrana sono in grado di interagire con i canali ionici modulandone l'attività. E' ovvio quindi che un anomalo funzionamento di uno qualsiasi di questi fattori, dovuto a mutazioni geniche nei canali o nelle loro subunità regolatorie, può essere in grado di indurre cambiamenti delle proprietà biofisiche delle correnti, inducendo gravi patologie. In tal caso, capire le cause delle canalopatie e le conseguenze delle mutazioni geniche che codificano per i canali ionici, può portare ad importanti scoperte sul loro ruolo nei fenomeni di eccitabilità neuronale e muscolare al fine di mettere a punto strategie diagnostiche e terapeutiche. Una corrente essenziale nella regolazione dell'eccitabilità sia cardiaca, sia di molte popolazioni neuronali, è la corrente condotta dai canali HCN. Si tratta di una corrente mista di ioni sodio e potassio che possiede la peculiarità di attivarsi in iperpolarizzazione. A livello cardiaco viene chiamata *I<sub>f</sub>* ed è la principale responsabile dell'autoritmicità dell'organo, mentre a livello neuronale viene definita *I<sub>h</sub>* ed espleta una serie di funzioni che vanno dalla regolazione del potenziale di riposo alla funzione di *pacemaker*. Come per gli altri canali anche per gli HCN sono ben note mutazioni in grado di alterare sia l'attività cardiaca sia la funzionalità neuronale. I canali HCN d'altro canto non agiscono da soli, ma sono al centro di un complesso *network* proteico formato da proteine regolatrici e di supporto.

Si presenta quindi di grande interesse lo studio sotto il profilo genetico, di questi interattori e del loro ruolo nel determinare eventuali alterazioni di funzionalità dei canali HCN potenzialmente coinvolte in patologie così diverse come i disturbi del ritmo e le epilessie idiopatiche. Capire il ruolo e la funzione di ciascuno di questi canali e relativi interattori è la grande sfida degli scienziati interessati a questo tipo di problematica.

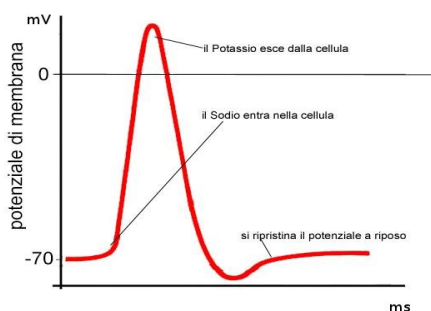
# L'EPILESSIA

Il termine epilessia deriva dal verbo greco *epilambanein* e significa essere colti di sorpresa; si tratta di un disturbo neurologico che si manifesta improvvisamente, cessa in maniera spontanea e tende a ripetersi nel tempo senza che il soggetto colpito abbia la possibilità di opporvisi. La malattia è nota fin dall'antichità, la sua insorgenza veniva associata con il tentativo di entità maligne di impossessarsi della mente umana. Ippocrate (400 a.C) fu il primo a dubitare di tale credenza, avanzando l'ipotesi che ci fosse una relazione tra traumi cranici e manifestazioni epilettiche; di fatto lo scienziato greco può essere considerato il primo a porre le basi per un approccio scientifico alla malattia. Tuttavia, solo nel XIX secolo, un neuroscienziato londinese Sir John Hughlings Jackson attraverso procedure scientifiche pose le basi neurofisiologiche alla comprensione degli accessi epilettici; al termine dei suoi studi definì l'evento epilettico come:

*“un'improvvisa scarica elettrica occasionale, eccessiva e rapida delle cellule nervose della materia grigia”.*

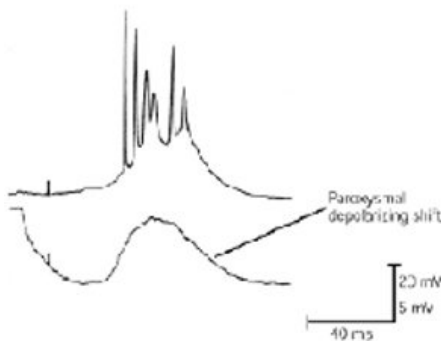
Successivamente, l'utilizzo di metodi d'indagine come l'elettroencefalogramma (introdotto da Hans Berger nel 1929) e di modelli sperimentali animali, sono risultati determinanti nel comprendere come l'attività elettrica di un neurone o di un gruppo di neuroni possa condurre all'insorgenza di una scarica epilettica.

Una delle caratteristiche delle cellule nervose è quella di essere eccitabili, ossia hanno la capacità di modificare il loro potenziale intracellulare in maniera tempo-dipendente e stereotipata in funzione di stimolo di varia natura, generando dei potenziali d'azione (Fig.1).



**Figura 1:** rappresentazione schematica di un potenziale d'azione

Le osservazioni sperimentali mostrano che la scarica epilettica fondamentalmente ha origine da un piccolo aggregato di neuroni, definito *focolaio epilettico*, che, a causa dell'instabilità del potenziale di membrana, presenta un'aumentata eccitabilità (Fig.2). Tale aumentata eccitabilità cellulare rappresenta una caratteristica distintiva di tutti gli accessi epilettici. L'attività elettrica patologica può non rimanere confinata al gruppo di neuroni da cui ha origine; le ricerche hanno infatti evidenziato che se l'attività epilettiforme del focolaio è sufficientemente intensa, questa ha la capacità di diffondere ad altre regioni cerebrali seguendo le normali vie di comunicazioni neuronali (Kandel *et Al.*, 2003).



**Figura 2** Ogni neurone che fa parte di un focolaio epilettico presenta una caratteristica risposta elettrica sincronizzata detta onda di depolarizzazione parossistica (ODP). L'ODP è generalmente costituita da una repentina depolarizzazione di grande ampiezza (20-40 mV) e di lunga durata (50-200 ms), che al picco presenta un treno di potenziali d'azione ed è seguita da iperpolarizzazione postuma. Le caratteristiche dell' ODP e dell'iperpolarizzazione postuma dipendono dalle proprietà intrinseche della membrana dei singoli neuroni (Kandel *et Al.*,2003).

Si ritiene che oggi le crisi epilettiche siano tra i disturbi neurologici più frequenti, si stima infatti che il 9-10% della popolazione mondiale abbia avuto almeno una crisi epilettica nel corso della sua vita. Tuttavia, l'insorgenza di una singola ed isolata crisi epilettica è considerata un evento pressoché irrilevante, tale da non rappresentare un criterio clinico sufficiente per definire un soggetto come affetto da epilessia. L'epilessia invece è definita come la manifestazione patologica associata all'insorgenza spontanea e ripetuta di crisi epilettiche. Per convenzione la diagnosi di epilessia richiede la ricorrenza nel soggetto di almeno due crisi epilettiche non provocate, ossia che non occorrono in stretta associazione temporale con un disturbo sistemico, tossico o metabolico a carico del sistema nervoso centrale (SNC). Inoltre, in molti casi i fattori che influenzano la tipologia e la gravità degli accessi epilettici, possono essere associati ad un particolare cluster di segni clinici, che conducono all'identificazione della *sindrome dell'epilessia*. Nel mondo la prevalenza dell'epilessia varia dallo 0.5% dei paesi industrializzati all'1.5% dei paesi in via di sviluppo (McHugh *et Al.*, 2008).

## Classificazione

Fino ad ora sono state descritte più di 50 sindromi epilettiche basandosi su numerosi parametri clinici (sintomatologia, età d'insorgenza, eziologia, ritmo sonno-veglia, risposte alle terapie farmacologiche, etc). La complessità della malattia, le osservazioni cliniche e le continue acquisizioni della ricerca in

campo molecolare, fanno sì che la classificazione delle epilessie sia in continua evoluzione.

In base alla sintomatologia clinica e al tracciato elettroencefalografico (EGG), che rappresenta il principale mezzo di indagine di questa patologia nell'uomo, le epilessie possono essere distinte in due categorie principali (Engel, 2006):

- **Epilessie generalizzate**
- **Epilessie parziali o focali**

Gli *accessi epilettici generalizzati* sono tra le forme più eclatanti. Tali accessi sono sostenuti da una scarica epilettica che fin dall'esordio interessa contemporaneamente vaste aree corticali di entrambi gli emisferi cerebrali e del ponte (sostanza reticolare) per cui il primo segno clinico associato è la perdita di coscienza. Inoltre, è ulteriormente possibile suddividere gli accessi epilettici generalizzati in base alla presenza o meno di crisi convulsive. Se la scarica epilettogena ha origine e si mantiene localizzata ad un gruppo di neuroni ristretto in una specifica area celebrale, si utilizza il termine di *crisi parziale* che pertanto, presenta una fenomenologia coerente con le funzioni associate alle specifiche aree cerebrali colpite. Queste crisi non sono associate a perdita di coscienza. Esistono casi in cui la scarica epilettogena, ristretta inizialmente ad una specifica regione cerebrale, può diffondere più o meno rapidamente attraverso connessioni sinaptiche ad altre regioni, dando origine a quella che viene definita una *crisi epilettica con generalizzazione secondaria*.

Un'ulteriore metodo di classificazione delle varie forme epilettiche è basato sugli aspetti eziologici (Engel, 2006) ed in questo caso si parla di epilessie:

- **Idiopatiche**
- **Sintomatiche**
- **Criptogenetiche**

Il termine *idiopatico* descrive uno stato epilettico che si manifesta in assenza di lesioni strutturali encefaliche rintracciabili. Queste forme epilettiche sono considerate a trasmissione genetica, inoltre la loro insorgenza è legata all'età (la maggior parte delle epilessie idiopatiche si manifesta sin dall'infanzia).

Il termine *sintomatico* fa riferimento ad una condizione epilettica che segue uno o più danni strutturali cerebrali che possono essere accertati. Danni cerebrali possono intercorrere prima o dopo la nascita e possono essere dovuti ad un anomalo sviluppo dell'encefalo, a malattie infettive del sistema nervoso, a tumori cerebrali, a ictus, a malformazioni dei vasi cerebrali e a traumi fisici.

Il termine *criptogenetiche* è stato adottato per definire forme epilettiche ad eziopatogenesi incerta, per le quali si può postulare una causa ma non si riesce a determinarne l'origine. In generale, comunque, si ritiene che la causa possa essere una lesione cerebrale non ancora identificata; difatti con l'avvento di



metodi diagnostici di indagine della struttura cerebrale, come la risonanza magnetica, è stata riconosciuta per molte di queste una causa sintomatica. Per questo, oggi si preferisce definire tali forme *come probabilmente sintomatiche*. Sia le forme epilettiche sintomatiche che criptogenetiche al contrario delle forme idiopatiche possono insorgere a qualsiasi età.

## Canali Ionici ed Epilessia

Ad oggi si stima che circa il 30 % delle epilessie siano idiopatiche, ossia abbiano una base genetica (Berkovic *et Al.*, 2006). Comprendere il ruolo eziologico dei fattori genetici nella patogenesi dell'epilessia è complesso. Studi di genetica molecolare e clinica condotti su famiglie hanno evidenziato che solo rare forme di epilessie idiopatiche sono sostenute da meccanismi mendeliani di ereditarietà su base monogenica. Nella maggioranza delle forme epilettiche idiopatiche è invece necessario assumere un modello di trasmissione dei caratteri più complesso di tipo poligenico, dove mutazioni in diversi geni concorrono all'insorgenza della malattia. Le ricerche hanno inoltre evidenziato che le modalità di trasmissione delle diverse forme epilettiche non dipendono esclusivamente dal numero di geni coinvolti, ma un ruolo importante assume anche l'interazione tra i geni e i fattori ambientali. In questo contesto comprendere l'impatto che ogni mutazione ha sull'insorgenza del fenotipo epilettico può essere difficile, poiché l'influenza di fattori ambientali esterni, sia fisici che sociali, può sommarsi a quella di fattori ambientali interni come gli effetti epigenetici e il background genetico del paziente (Steinlein., 2004).

Oltre al tentativo di definire le modalità di trasmissione genetica delle epilessie, gli studi di genetica molecolare hanno fornito importanti indicazioni alla comprensione della patogenesi molecolare del fenomeno epilettico. Le epilessie idiopatiche sono principalmente causate da mutazioni nei geni che codificano per canali ionici (Tab. 1).

| Tipo di canale                         | Simbolo del gene         | Fenotipo  |
|----------------------------------------|--------------------------|-----------|
| <b>ATTIVATI DA LIGANDO</b>             |                          |           |
| Recettori GABA-A                       | <i>GABRG2/GABRA1</i>     | GEFS+/IGE |
| Recettore nicotinico dell'acetilcolina | <i>CHRNA4/CHRNA2</i>     | ADNFLE    |
| <b>ATTIVATI DAL VOLTAGGIO</b>          |                          |           |
| Canali del sodio                       | <i>SCN1A/SCN2A/SCN1B</i> | BFNC      |
| Canali del potassio                    | <i>KCNQ2/KCNQ3</i>       | GEFS+     |
| Canali del cloro                       | <i>CLCN2</i>             | IGE       |
| Canali del calcio                      | <i>CACNA1H</i>           | IGE       |

**Tabella 1:** Alcuni dei geni codificanti per subunità di canali ionici coinvolti in sindromi epilettiche umane; *ADNFLE*, epilessia autosomica dominante del lobo frontale; *BNFC*, convulsione neonatale familiare benigna; *GEFS+*, epilessia generalizzata con attacchi febbrili; *IGE*, epilessia idiopatica generalizzata.

I canali ionici principalmente coinvolti appartengono sia alla classe dei canali attivati da voltaggio che a quella dei canali attivati da ligando. Ai canali attivati da voltaggio è riconosciuto un ruolo fondamentale nella generazione e nel mantenimento del potenziale d'azione delle cellule neuronali, mentre i canali attivati da ligando sono comunemente coinvolti nei processi di comunicazione neuronale che si svolgono a livello delle terminazioni sinaptiche. Il coinvolgimento di queste proteine, da un lato conferma le ipotesi sperimentali ottenute precedentemente, quelle secondo cui gli accessi epilettici sono un fenomeno strettamente connesso all'eccitabilità delle cellule nervose e alla trasmissione sinaptica, dall'altro permette di includere alcune forme di epilessia nella famiglia delle *canalopatie*. Il termine *canalopatie* viene comunemente adottato per indicare patologie associate a difetti nella struttura/funzione di proteine canale o nelle loro subunità accessorie.

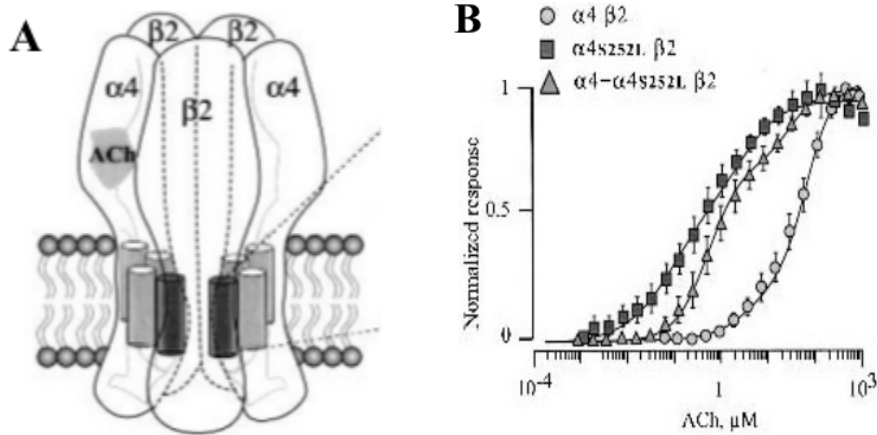
Ma come possono difetti nella struttura di questi canali predisporre all'insorgenza di attacchi epilettici? La generazione e il flusso di informazioni che caratterizza l'attività cellulare del sistema nervoso è dovuto a segnali elettrici generati dai canali ionici. Per ogni cellula nervosa lo stato di eccitabilità e la capacità di comunicare con altre cellule è funzione delle proprietà dei canali ionici (densità, specie

ionica permeante, direzione del flusso, stato di apertura/chiusura) che esprime in superficie. Questi canali, modificando transitoriamente e rapidamente la propria permeabilità agli ioni, possono indurre l'insorgenza di potenziali d'azione che permettono alle cellule neuronali di generare, trasmettere e ricevere impulsi elettrici. La generazione di questi eventi richiede che la cellula sia capace di integrare adeguatamente stimoli eccitatori ed inibitori e, in condizioni fisiologiche, questa capacità permette il normale funzionamento dei circuiti neuronali. Mutazioni che alterano le proprietà dei canali ionici possono influenzare questo bilanciamento, predisponendo all'insorgenza di disordini che possono essere associati a fenomeni di iper o ipo-eccitabilità del sistema nervoso (Kullmann *et Al.*, 2002) Secondo questa interpretazione, visto che le scariche epilettiche sono fenomeni iper-eccitatori, potrebbero essere causate da:

- **Ridotta capacità degli stimoli inibitori di contrastare stimoli eccitatori**
- **Potenziamento degli stimoli eccitatori rispetto agli stimoli inibitori**

Per comprendere meglio come questi meccanismi alterati possano favorire l'insorgenza di scariche epilettiche, consideriamo dei casi in cui è nota l'associazione tra alcune sindromi epilettiche umane e canali ionici mutati.

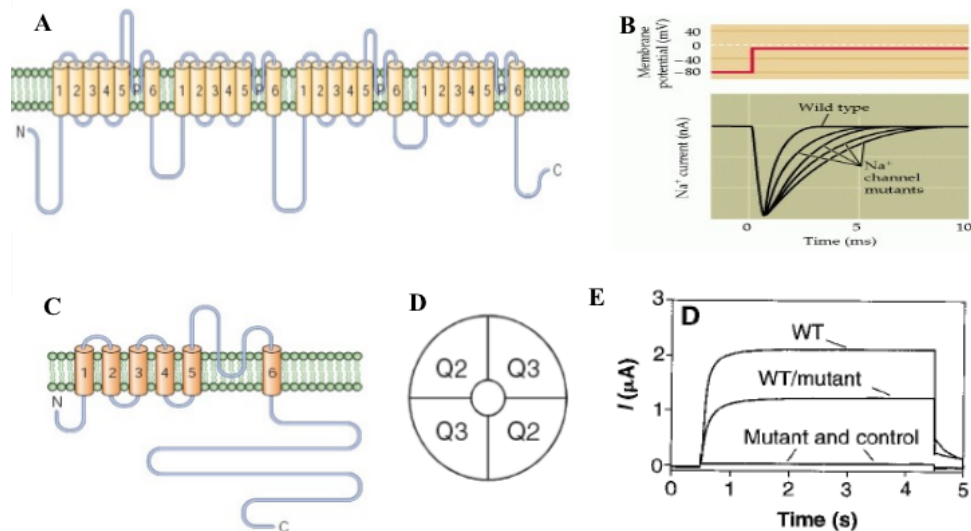
L'epilessia notturna autosomica dominante del lobo frontale (ADNFLE) è stata la prima sindrome epilettica umana associata a difetti nella struttura di canali ionici. Mutazioni responsabili di questa rara forma di epilessia che si manifesta con attacchi durante il sonno, sono state individuate nei geni *CHRNA4* e *CHRNA2* (Steinlein *et Al.*, 1995; Fusco *et Al.*, 2000). Entrambi i geni codificano per subunità dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs) (Fig. 3A). L'espressione di questi canali permeabili ai cationi  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$  e  $Na^{+}$  ,è molto diffusa nel cervello, in particolare a livello dei terminali pre- e post-sinaptici di interneuroni e neuroni piramidali. Uno dei ruoli maggiori attribuiti agli nAChRs è quello di modulare il rilascio di neurotrasmettitori come il GABA e il glutammato (Alkondon and Albuquerque., 2004). La principale caratteristica che accomuna tutte le mutazioni ad oggi individuate, è un aumentata sensibilità dei recettori nicotinici per l'acetilcolina (Bertrand *et Al.*, 2002; Hoda *et Al.*, 2008) (Fig. 3B). Sebbene non sia ancora chiaro come l'aumentata sensibilità per l'acetilcolina possa favorire l'insorgenza dell'ADNFLE, si pensa che le scariche epilettiche siano dovute a difetti nel rilascio dei neurotrasmettitori (Weiland *et Al.*, 2000).



**Figura 3: A)** i canali nAChRs sono dei pentameri, l'isoforma più espressa nel cervello è costituita dalle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  codificate rispettivamente dai geni *CHRNA4* e *CHRN2*. **B)** Curva dose-risposta dell'acetilcolina per una delle mutazioni,  $\alpha 4S252L$ , associate con l'ADNFLE. Il canale che porta la mutazione  $\alpha 4S252L$  in eterozigosi (triangoli) all'aumentare dell'acetilcolina mostra una maggiore conduttanza rispetto al canale WT (cerchi) (Bertrand et Al., 2002). Anche tutte le altre mutazioni associate all'ADNFLE sottoposte alla stessa analisi mostrano un comportamento simile.

I canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio dipendenti (Nav) svolgono un ruolo principale nella frequenza e nel controllo della forma del potenziale d'azione. Questi canali si attivano rapidamente e conducono una corrente depolarizzante responsabile della fase di ascesa del potenziale d'azione.

Il canale nativo è formato da una subunità strutturale  $\alpha$  (Fig. 4A) in associazione ad 1-2 subunità  $\beta$  accessorie; nell'uomo 9 geni codificano per le subunità strutturali  $\alpha$ , mentre 4 geni codificano le subunità accessorie  $\beta$  (Catterall et Al., 2005). L'importanza di questi canali nel controllo dell'eccitabilità neuronale è confermata dall'evidenza che, ad oggi, numerose mutazioni nei geni che codificano sia le subunità  $\alpha$  (*SCN1A*, *SCN2A*) che  $\beta$  (*SCN1B*) sono responsabili dell'epilessia generalizzata con attacchi febbrili (GEFS+) (Reid et Al., 2009), sindrome che si manifesta nell'infanzia e di solito continua per tutta la pubertà. Le analisi funzionali hanno mostrato che molte di queste mutazioni causano un rallentamento dell'inattivazione dei canali Nav (Fig. 4B) (Barchi et Al., 1995). L'iper-eccitabilità delle cellule nervose alla base delle scariche epilettiche, potrebbe quindi in alcuni casi, essere dovuta ad un maggior influsso di sodio causato dalla prolungata apertura dei canali mutati. La prolungata depolarizzazione della membrana neuronale potrebbe perciò favorire l'insorgenza di una serie di potenziali d'azione spontanei (Lossin et Al.) 2002).



**Figura 4:** **A)** Il canale  $Na_V$  è formato da un'unica catena polipeptidica ( $\alpha$ ) che contiene quattro domini omologhi, ciascuno dei quali comprende sei  $\alpha$ -eliche ripetute, alle subunità  $\alpha$  si associano due subunità  $\beta$  che accelerano la cinetica di apertura del canale. **B)** Figura rappresentativa che illustra le differenze comunemente riscontrate nelle cinetiche tra il canale  $Na_V$  WT e alcuni canali mutati espressi in eterozigosi, riscontrati nei pazienti affetti da GEFS<sup>+</sup>; in molti casi i canali  $Na_V$  mutati mostrano una lenta cinetica di in attivazione rispetto al canale WT (Barchi et al., 1995). **C)** I geni *KCNQ2* e *KCNQ3* codificano delle subunità polipeptidiche che presentano sei domini transmembrana. **D)** Quattro di queste subunità si assemblano a formare il canale-M. **E)** La coespressione eteromericale del canale WT e della maggior parte dei canali *KCNQ2/KCNQ3* mutati associati alla BNFC mostra una riduzione della corrente di potassio rispetto al canale WT come quella mostrata in figura, riferita alla mutazione frameshift 534ins5pb del gene (Biervert et al., 1998), una delle mutazioni associate alla BNFC.

Un altro tipo di epilessia a trasmissione autosomica dominante è la convulsione neonatale familiare benigna (BNFC). Questa malattia è caratterizzata da attacchi brevi e frequenti che compaiono la prima settimana di vita e scompaiono spontaneamente entro pochi mesi. La BNFC è stata associata a mutazioni nei geni *KCNQ2* e *KCNQ3* (Fig. 4C); questi due geni codificano per le subunità del canale-M (Fig. 4D), un canale del potassio voltaggio-dipendente contraddistinto da una lenta cinetica di apertura e diffuso ubiquitariamente nel cervello (Wang et Al., 1998). Il canale-M si attiva in depolarizzazione e conduce una corrente iperpolarizzante di potassio (corrente-M) producendo il ritorno del potenziale d'azione ai valori vicini al potenziale di riposo. Di fatto questo canale opponendosi in maniera sostenuta alla depolarizzazione della membrana ne riduce l'eccitabilità, regolando il numero di potenziali d'azione che ogni neurone può generare (Brown, 1988).

Non stupisce, che la maggioranza delle mutazioni nei geni *KCNQ2* e *KCNQ3* associati alla BNFC causino una diminuzione della corrente-M, come per esempio si verifica nel caso della mutazione frameshift 534ins5pb descritta da Biervert e colleghi (Fig. 4E). In molti casi dunque, l'iper-eccitazione neuronale sarebbe quindi giustificata da una riduzione di questa corrente, che favorirebbe una aumentata risposta dei neuroni agli impulsi sinaptici e la tendenza a generare con maggior frequenza potenziali d'azione.

# **DISTURBI DEL RITMO CARDIACO**

Il ritmo di contrazione cardiaco è generato dal nodo senoatriale (NSA) ed è detto ritmo sinusale. Normalmente nell'uomo adulto il ritmo oscilla tra i 60 e i 100 battiti per minuto (bpm), mentre diminuisce durante il sonno e aumenta durante lo sforzo fisico (può superare i 200 bpm, con un valore massimo dipendente dall'età. Esistono inoltre altri distretti cardiaci, quali il nodo atrioventricolare (NAV) e le fibre del Purkinje, in grado di generare ritmi (detti ritmi ectopici o non sinusali) e che possono quindi intervenire, anche se a una frequenza minore, in caso di interruzione del ritmo sinusale.

Le alterazioni della fisiologia del ritmo (aritmie) sono piuttosto diffuse nella popolazione e si pensa che la loro origine possa essere dovuta a fattori ambientali e/o genetici. Le aritmie possono essere suddivise in base all'effetto sulla frequenza cardiaca; principalmente, è possibile distinguere le tachiaritmie (caratterizzate da una frequenza cardiaca aumentata) e le bradiaritmie (caratterizzate da una riduzione della frequenza cardiaca). Le aritmie si manifestano generalmente con palpitazioni, "consapevolezza" del battito, pause nel normale ciclo cardiaco o combinazioni di questi fattori; meno comunemente sfociano in sincope, angina, insufficienza cardiaca o morte. L'analisi del ritmo si effettua tramite elettrocardiogramma o ECG. (Fig. 3)

## **L'attività autoritmica del cuore**

Il ritmo cardiaco viene generato spontaneamente nel NSA, una regione anatomicamente situata nell'atrio destro in corrispondenza dello sbocco della vena cava superiore, composta da cellule altamente specializzate. Queste cellule di natura muscolare sono dette pacemaker e hanno lo specifico compito di originare e trasmettere l'impulso elettrico verso gli altri compartimenti cardiaci per mezzo della connessione elettrica cellula-cellula operata dalle GAP junction. Le GAP junction sono strutture composte da particolari proteine, le connessine, che formano dei pori a livello delle zone di contatto e adesione (dischi intercalari). L'elevata conduttanza di queste strutture permette una rapida diffusione dell'impulso. Dal NSA l'impulso si sposta negli atri provocandone la contrazione e, attraverso le vie internodali, raggiunge in 0,03 secondi il NAV, unico punto di collegamento elettrico tra atri e ventricoli. Il NAV si trova nella parte posteriore destra del setto interatriale, in prossimità dell'orifizio del seno coronarico. Trasmette l'impulso, ricevuto dal NSA, al fascio di His rallentandone la velocità; inoltre il NAV è in grado di bloccare gli impulsi a frequenza troppo elevata, proteggendo i ventricoli dal rischio di

fibrillazione (Figura 2). Il ritardo nodale, di 0,09 secondi, è fondamentale ai fini del corretto funzionamento del cuore: permette la separazione temporale della contrazione di atri e ventricoli così che questi possano ricevere il sangue dai primi e solo successivamente contrarsi e spingere il sangue nelle arterie. Altra importante proprietà del NAV è quella di fungere da isolante elettrico tra le camere atriali e quelle ventricolari, conferendo unidirezionalità all'impulso grazie ad uno strato fibroso, responsabile di un ulteriore ritardo di 0,04 secondi nella propagazione, che impedisce allo stimolo il ritorno verso gli atri. Infine il nodo atrioventricolare è dotato di un'attività autoritmica ectopica con frequenza intrinseca inferiore a quella del NSA, capace di subentrargli in caso di malfunzionamenti. Il fenomeno di dominanza del ritmo senoatriale è detto *overdrive suppression* ed è dovuto al fatto che i miociti cardiaci, essendo accoppiati elettricamente, vengono guidati da chi genera potenziali d'azione ad una frequenza più elevata, sopprimendo l'automaticità di altri foci ectopici (Langerdorf, 1971; Runge, 1973; Fish, 1984). Il fascio di His, o fascio intraventricolare, si divide poi in una branca destra ed una sinistra che si dirigono verso la corrispondente porzione apicale del cuore, originando per tutta la loro lunghezza le fibre del Purkinje. Le fibre del Purkinje sono di grossa dimensione, penetrano all'interno del miocardio ventricolare formando una rete e conducono i potenziali d'azione molto rapidamente permettendo una quasi immediata trasmissione dell'impulso attraverso l'intero sistema ventricolare.

### ***Potenziali d'azione***

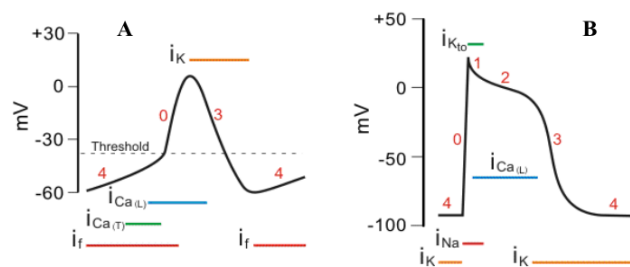
Le cellule cardiache sono caratterizzate da potenziali d'azione di forma differente (Fig. 1) a causa delle diverse correnti che prendono parte alla loro generazione, diretta conseguenza dell'espressione differenziale di specifici canali ionici. Si possono distinguere due tipologie di cellule cardiache: il primo tipo (detto a risposta rapida) comprende miociti della muscolatura atriale, miociti della muscolatura ventricolare, fascio di His e fibre del Purkinje, il secondo tipo (detto a risposta lenta) comprende le cellule del NSA e del NAV. I miociti a risposta rapida (Fig. 1B) possiedono un potenziale d'azione di durata di 100-200 ms caratterizzato da quattro fasi. La fase 0 è la fase di depolarizzazione rapida, si verifica quando il potenziale di membrana passa dal valore di riposo di -90 mV al potenziale di apertura dei canali di sodio voltaggio dipendenti rapidi, -70 mV. In seguito all'apertura di alcuni di questi canali si ha l'ingresso in cellula di ioni  $\text{Na}^+$  (corrente  $I_{\text{Na}}$ ) secondo il gradiente elettrochimico, questo porta all'aumento del valore di potenziale e di conseguenza all'apertura di ulteriori canali di sodio voltaggio dipendenti. Quando un numero sufficiente di canali è stato aperto il fenomeno diventa autocatalitico, con un massiccio ingresso di ioni  $\text{Na}^+$  che porta il potenziale ad un picco di +30 mV in 2-3 ms. La fase 1 è la fase di ripolarizzazione rapida, inizia con l'inattivazione della corrente  $I_{\text{Na}}$  e l'apertura dei canali di potassio voltaggio dipendenti che fanno passare la  $I_{\text{Kto}}$ , una corrente di ioni  $\text{K}^+$  che inizia a riportare il potenziale



verso valori più negativi.  $I_{Kto}$  è una corrente transiente uscente che inizia ad attivarsi già durante la parte finale del picco di depolarizzazione della fase 0, andando incontro ad inattivazione durante la successiva fase di *plateau* del potenziale d'azione. La fase 2 è la fase di plateau. È dovuta all'ingresso di ioni  $Ca^{2+}$  che contrastano la perdita di cariche positive dovuta alla fuoriuscita di potassio. I primi canali ad aprirsi sono i canali T, transienti voltaggio dipendenti, che portano all'apertura dei canali L, long lasting, i quali fanno entrare il calcio responsabile dell'accoppiamento eccitazione- contrazione. L'elevata durata della fase di plateau è dovuta alla non completa inattivazione dei canali di calcio.

La fase 3, la ripolarizzazione finale, inizia con l'inattivazione dei canali di calcio lasciando solamente le correnti di potassio che tendono ad abbassare il potenziale di membrana. Si hanno la  $I_{Ks}$  (slow), la  $I_{Kur}$  (ultra rapid, solo nei miociti atriali) e la  $I_{Kr}$ . Per ultima si ha la fase 4 di riposo, con attivazione della  $I_{K1}$  che riporta il potenziale verso i valori di equilibrio elettrochimico del potassio e mantiene la cellula iperpolarizzata fino all'arrivo del successivo stimolo soprasoglia.

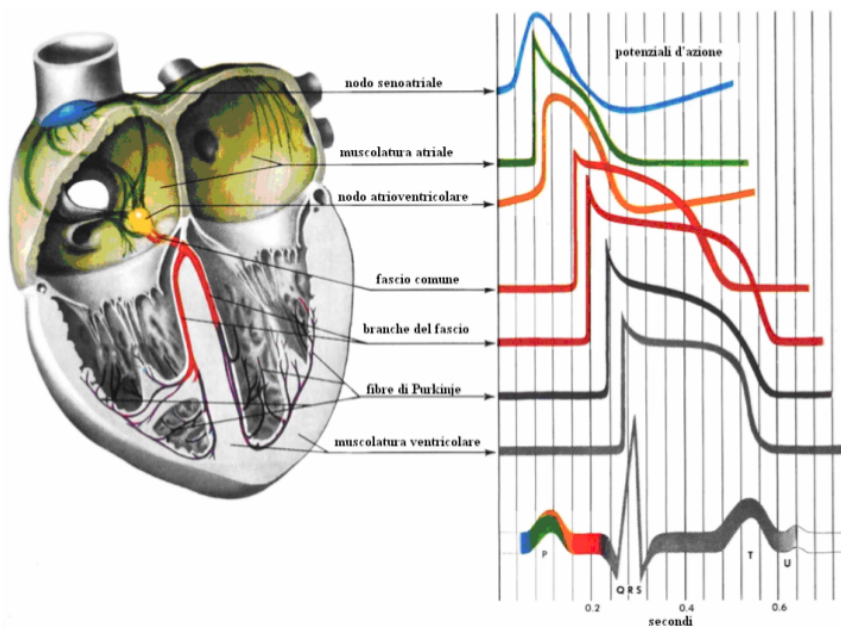
Le cellule del NSA sono a risposta lenta (Fig. 1A) e hanno un tipico potenziale d'azione che si differenzia da quello ventricolare. Innanzitutto manca una fase di riposo e nella fase 4 si verifica la depolarizzazione diastolica lenta (DDL). Questo fenomeno spontaneo consiste nel lento innalzamento del potenziale dal valore più negativo raggiungibile (il potenziale diastolico massimo) di circa -55 mV al valore soglia di -40 mV necessario per la formazione del potenziale d'azione. Il potenziale diastolico massimo è dovuto alla bassa permeabilità della membrana agli ioni  $K^+$  per mancanza della  $I_{K1}$  nelle cellule senoatriali con conseguente assenza della fase di riposo (requisito per la depolarizzazione diastolica lenta e quindi per l'attività autoritmica delle cellule stesse).



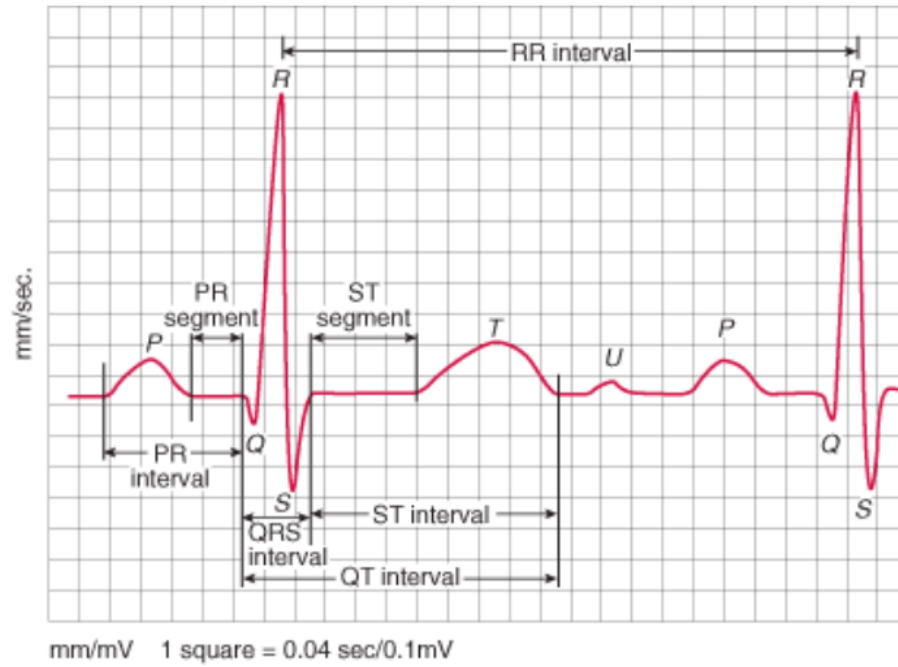
**Figura 1:** A. Potenziale d'azione senoatriale. B. Potenziale d'azione ventricolare.

La depolarizzazione diastolica lenta è dovuta ad una particolare corrente, la  $I_f$  (funny current), una corrente cationica mista (sostenuta da ioni  $Na^+$  e da ioni  $K^+$ ), tempo e voltaggio dipendente, che si attiva in iperpolarizzazione a potenziali inferiori ai -35 mV e, in condizioni fisiologiche, permette il transito prevalentemente di ioni  $Na^+$  all'interno della cellula (corrente entrante). Intorno a -50 mV intervengono anche i canali di calcio di tipo T che accompagnano la depolarizzazione fino ai valori di

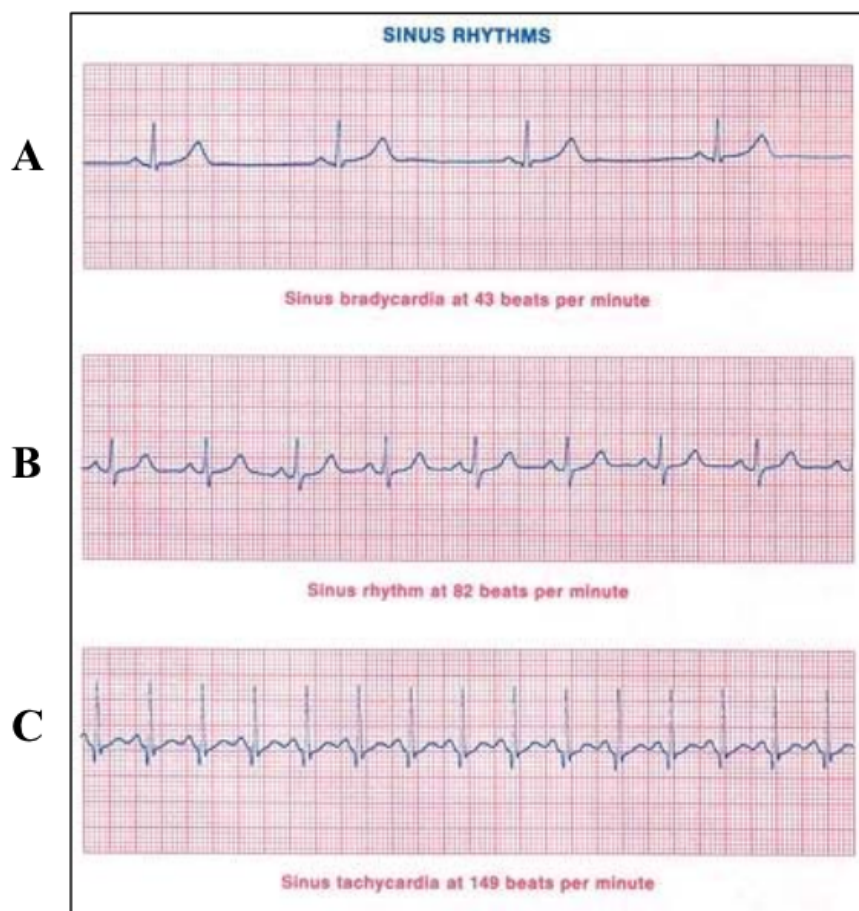
attivazione dei canali di calcio di tipo L ( $-30\text{ mV}$ ) con l'inizio della fase 0. Il flusso di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  permette il raggiungimento della fase ascendente del potenziale d'azione. La lentezza che contraddistingue la fase 0 rispetto a quella ventricolare è dovuta alle cinetiche dei canali di calcio, più lenti dei canali di sodio. Nelle cellule pacemaker è assente la fase 1, poiché manca la corrente  $\text{IKto}$ , mentre la fase 2 è molto più breve in quanto i canali di calcio sono già stati attivati nella fase 0 ed iniziano ad inattivarsi.



**Figura 2:** Schema della distribuzione dei potenziali d'azione nei diversi distretti cardiaci del tessuto di conduzione.



**Figura 3:** Schema del tracciato ECG



**Figura 4:** ECG a confronto. A. Bradicardia. B. Ritmo sinusale normofrequente. C. Tachicardia sinusale

## Tachicardia sinusale

Si definisce tachicardia sinusale inappropriata (TSI) un aumento della frequenza cardiaca fino a valori superiori alla norma, che si presenta spontaneamente e persiste, in condizioni di riposo, o a causa di un'esagerata risposta a stress o esercizio fisico. Gli ECG hanno una morfologia generale regolare, con una diminuzione della distanza tra i singoli complessi PQRST (Fig. 4C). La TSI non è associata a disfunzioni strutturali del cuore e può essere dovuta ad un aumento di eccitabilità del nodo del seno, ad una diminuita efficienza inibitoria del vago, ad un'aumentata attività stimolatoria del sistema simpatico o ad un incremento della sensibilità dei recettori  $\beta$ -adrenergici. Per i pazienti sintomatici la terapia prevede l'utilizzo di  $\beta$ -bloccanti e  $\text{Ca}^{2+}$  antagonisti; nel caso non ci sia risposta si può procedere all'ablazione del NSA e all'impianto di un pacemaker elettronico (Lee *et Al.*, 1995). Inizialmente si riteneva che la TSI fosse una patologia piuttosto rara e che non avrebbe portato alla disabilità totale, tuttavia, durante

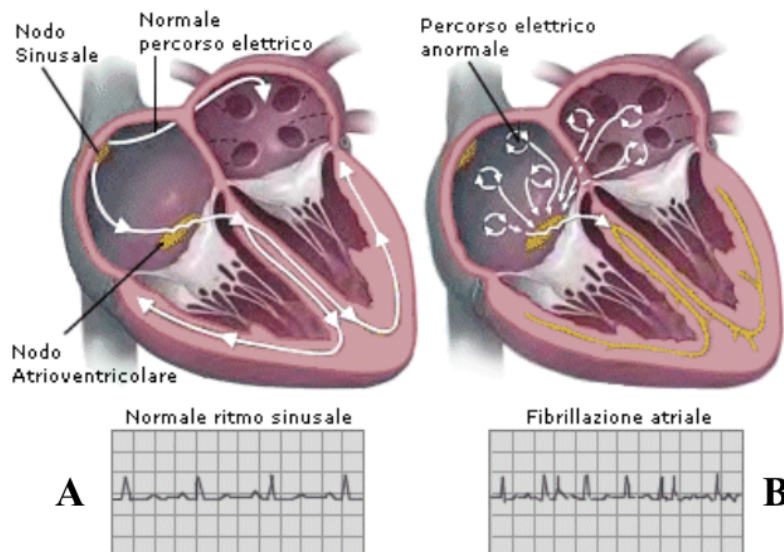
gli ultimi anni è stata diagnosticata con più frequenza, grazie ad una migliore caratterizzazione clinica della patologia oltre che ad un miglioramento delle tecniche di diagnosi (Lee *et Al.*, 1997). In diverse pubblicazioni inoltre è stato indicato che le donne sembrerebbero essere più soggette all'insorgenza della TSI (Baurfiend *et Al.*, 1979; Krahn *et Al.*, 1995; Sgarbossa *et Al.*, 1995).

Dal punto di vista genetico c'è ancora poca chiarezza solo una particolare forma di tachicardia è stata caratterizzata sotto questo punto di vista, la tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT).

La CPVT è una patologia aritmogena ereditaria associata a rischio di sincopi e MCI durante esercizio fisico o stress emotivo. Il quadro aritmico tipico è rappresentato una tachicardia ventricolare che può degenerare in tachicardia ventricolare polimorfica o fibrillazione ventricolare. I geni implicati in questa patologia sono RyR2, il recettore cardiaco per la rianodina e CASQ2, la calsequestrina cardiaca. (Shimpf *et Al.*, 2009; Priori *et Al.*, 2002).

## Fibrillazione atriale

La fibrillazione atriale (FA) è la più comune forma di aritmia e può essere parossistica (FAP) o cronica, è dovuta all'attivazione disorganizzata, rapida e irregolare degli atri a causa di foci ectopici solitamente prossimi all'apertura delle vene polmonari (Fig. 5). In questo caso la frequenza di scarica ectopica è maggiore rispetto a quella senoatriale, arrivando fino a superare i 300 battiti al minuto.



**Figura 5:** ECG a confronto. A. Ritmo sinusale normofrequente. B. Fibrillazione atriale

L'alta frequenza degli impulsi impedisce una contrazione atriale efficace, inoltre il passaggio atrio-ventricolare degli impulsi è del tutto irregolare per cui il battito cardiaco risulta aritmico con frequenze che variano dalla bradiaritmia alla tachiaritmia. La fibrillazione atriale può verificarsi anche se raramente in soggetti normali in situazioni di stress psicofisico intenso, intossicazione farmacologica, in pazienti con cardiomiopatie, e malattie metaboliche.

Le basi genetico-molecolari della fibrillazione atriale devono ancora essere ben definite. Un possibile approccio a questo problema è quello di identificare il gene responsabile della forma familiare della malattia (Roberts *et Al.*, 2006 ). È stata identificata una famiglia in cui la fibrillazione atriale segrega come un tratto autosomico dominante ed il gene responsabile è localizzato sul cromosoma 10 (Brugada *et Al.*, 1997). È stata descritta l'associazione tra fibrillazione atriale familiare e la mutazione del gene KCNQ1 sul cromosoma 11 che determina la struttura dei canali del potassio nei miociti atriali (Chen *et Al.*, 2003).

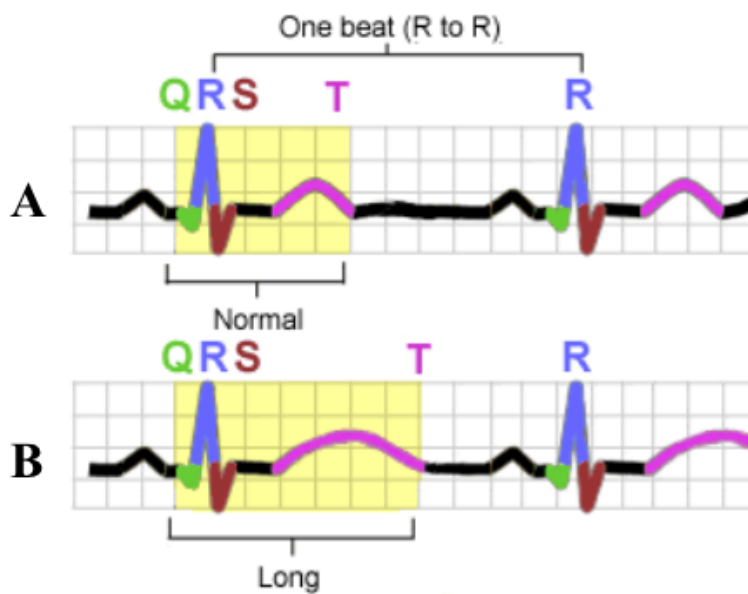
Uno *screening* molecolare condotto su 28 famiglie cinesi con fibrillazione atriale a trasmissione autosomica dominante ha identificato la mutazione del gene KCNE2, codificante per una subunità accessoria dei canali al potassio. Le mutazioni individuate portano entrambe a un aumento della funzione del canale al potassio, associato all'accorciamento del periodo refrattario atriale (Yang *et Al.*, 2004) . Un analogo *screening* molecolare condotto su 30 famiglie cinesi ha identificato una mutazione sul gene KCNJ2, che codifica per un'altra subunità accessoria dei canali al potassio; la mutazione causa un aumento della funzione del canale, che potrebbe essere associato all'induzione o al mantenimento della fibrillazione atriale. Alcuni studi indicano che il polimorfismo di alcuni geni aumenta la vulnerabilità atriale e la propensione a sviluppare la fibrillazione atriale. La variante polimorfica G38 del gene KCNE1 (altra subunità accessoria dei canali al potassio) è associata ad un maggior rischio di sviluppare fibrillazione atriale (Lai *et Al.*, 2002). Due studi recenti hanno fornito ulteriori dati a sostegno di un'ipotesi "genetica" per la fibrillazione atriale. Uno ha mostrato come la mutazione di una proteina di giunzione intercellulare, la connessina 40, responsabile dell'attivazione elettrica coordinata dell'atrio, possa predisporre all'insorgenza dell'aritmia (Gollob *et Al.*, 2006). L'altro ha evidenziato l'associazione tra un comune polimorfismo dello SCN5A (gene del canale sodio del muscolo atriale) e fibrillazione atriale isolata ("lone fibrillation"), facendo ipotizzare l'azione proaritmica di farmaci bloccanti il canale sodio nei pazienti portatori di tale polimorfismo (Chen *et Al.*, 2007) Tuttavia questo approccio è ancora in una fase iniziale e molto resta da capire, dalla definizione della proporzione dei casi con fibrillazione atriale legata ad alterazioni genetiche alla conoscenza della fisiopatologia della fibrillazione atriale in queste condizioni geneticamente determinate.

## Sindrome del QT lungo

La Sindrome del QT-lungo (Long QT Syndrome, LQTS) è una malattia cardiaca ereditaria che si presenta con un ECG caratterizzato nella maggior parte dei casi da un prolungamento dell'intervallo QT (corrispondente alla fase di ripolarizzazione dei ventricoli) (Fig. 9) e ad alterazioni morfologiche nella ripolarizzazione. Spesso è associata a sincope, colpo apoplettico e morte improvvisa in soggetti giovani e senza altri problemi di salute. La morte improvvisa è dovuta ad aritmie letali (per es. fibrillazione ventricolare) che avvengono tramite attivazione simpatica soprattutto durante il sonno.

Durante i primi studi di questa malattia, fu formulata un'ipotesi che sosteneva come causa delle aritmie un'anormale innervazione del cuore da parte del sistema nervoso autonomo (Sympatric Imbalance Hypothesis) (Schwartz *et Al.* 1991). Analisi e studi genetici confutarono la teoria e dimostrarono che la predisposizione allo sviluppo delle aritmie ventricolari è la conseguenza di determinate alterazioni genetiche che portano a mutazioni nei canali ionici del cuore (Priori *et Al.* 2000). Ciò considerato, la LQTS viene annoverata tra le canalopatie.

Ad oggi sono state descritte più di 500 mutazioni che causano la LQTS, a carico di 10 geni che codificano principalmente per canali cardiaci del potassio e del sodio o per loro proteine accessorie (tabella 3). Nella maggior parte dei casi si tratta di soggetti portatori di un solo allele disfunzionale (eterozigoti); nel raro caso di soggetti omozigoti, la disfunzionalità del canale si esprime nelle forme più gravi della patologia. Nonostante i passi avanti fatti in questo campo, una diagnosi genetica non può essere stabilita nel 25-30% dei pazienti (Tester *et Al.*, 2005; Napolitano *et Al.*, 2005) e la penetranza, ossia la percentuale di pazienti che hanno la mutazione e manifestano il fenotipo, varia dal 25% al 90% (Priori *et Al.*, 1999). Meno frequentemente ci possono essere variazioni nell'espressione della malattia, con diversi fenotipi risultanti dalla stessa mutazione. Tuttavia gli studi di genetica molecolare sviluppati nel corso degli ultimi 11 anni hanno evidenziato importanti correlazioni genotipo-fenotipo, che hanno contribuito a guidare l'approccio al trattamento. Inoltre, studiando i frequenti polimorfismi non sinonimi riscontrati nei pazienti, sono state effettuate interessanti osservazioni sulla suscettibilità individuale a sviluppare aritmia, un aspetto di notevole interesse per il settore della farmacogenomica (Medeiros-Domingo *et Al.*, 2007).



**Figura 9:** La Sindrome del QT-lungo. A normale. B lungo.

## Sindrome del QT corto (SQTS)

Entità clinica di recente scoperta, associata ad un'alta incidenza di morte cardiaca improvvisa, sincope e/o fibrillazione atriale anche in giovani pazienti e nei neonati. I pazienti con questa alterazione elettrica congenita presentano intervalli QT più brevi. Mutazioni missenso nel gene *KCNH2* associate ad un guadagno di funzione in *IKr*, sono state identificate in due famiglie con morte cardiaca improvvisa familiare. Recentemente, sono state identificate ulteriori mutazioni gain of function nel gene *KCNQ1* codificante la subunità alfa del canale *KvLQT1* (*IKs*), e nel gene *KCNJ2*. Il defibrillatore cardioverter impiantabile (ICD) è la terapia di scelta nei pazienti con sincope ed una storia familiare di morte cardiaca improvvisa (Shimpf *et Al.*, 2009; Hedley *et Al.*, 2009; Schimpf *et Al.*, 2005).

## Bradicardia sinusale

La bradicardia sinusale inappropriata (BSI) è caratterizzata dalla presenza di una frequenza cardiaca inferiore ai 60 bpm in un soggetto adulto a riposo; l'ECG mostra un'onda P morfologicamente normale



e si ha un intervallo PR superiore a 120 ms (Fig. 4A). La bradicardia sinusale può essere dovuta ad un eccessivo tono vagale, ad una ridotta attività del sistema simpatico, ad anomalie anatomiche o elettrofisiologiche del nodo del seno, all'assunzione di determinati farmaci come i  $\beta$ -bloccanti e la digitale, a patologie come la Sindrome del Seno malato, oppure può essere fisiologica e negli atleti per iperstimolazione vagale. Generalmente è benigna e non richiede trattamenti, ma se si presentano sintomi come vertigine, sincopi, nausea, confusione e ipotensione, la terapia prevede l'utilizzo di farmaci come l'atropina e l'isoproterenolo, mentre nei casi che presentano aritmie ventricolari è necessario l'impianto di un pacemaker elettronico. Alcune mutazioni nei canali HCN sono state identificate come responsabili di forme di bradicardia familiare; per la descrizione si rimanda al capitolo appositamente dedicato: "Canali HCN e disturbi del ritmo cardiaco" a pagina 46.

## **Sindrome di Brugada**

La Sindrome di Brugada è una malattia ereditaria che causa morte improvvisa per arresto cardiaco in individui apparentemente sani e con un cuore strutturalmente sano. Le mutazioni che causano la sindrome di Brugada sono state individuate finora nei geni SCN5A; GPD1-L (Shimpf *et Al.*, 2009; Antzelevitch, 2006; London *et Al.*, 2007).

# I CANALI HCN

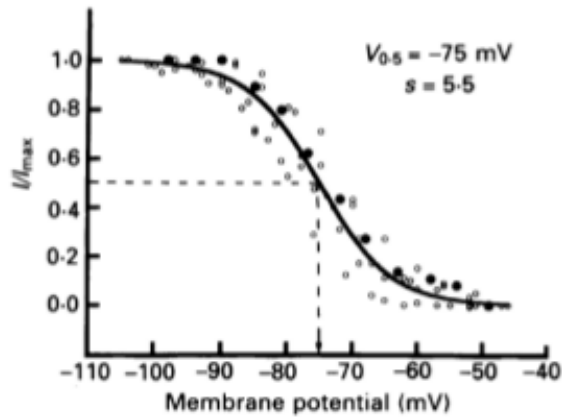
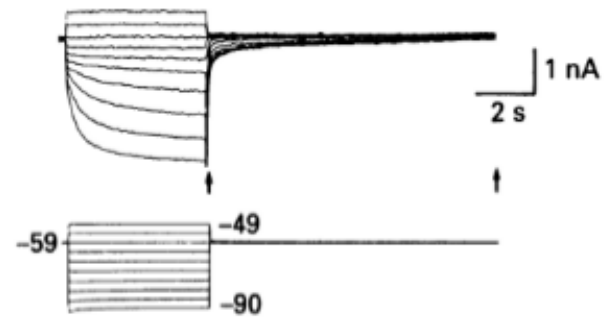
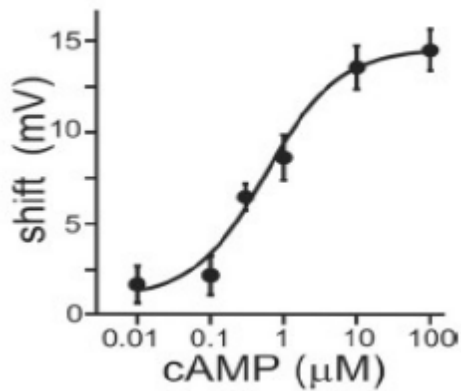
Alla fine degli anni 90 è avvenuto il riconoscimento molecolare di una nuova famiglia di canali ionici designati con l'acronimo HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel). Il nome attribuito identifica le loro principali caratteristiche biofisiche, infatti la loro capacità di condurre corrente è influenzata dal voltaggio di membrana ed è modulabile dalla loro interazione con i nucleotidi ciclici. Nell'uomo sono stati identificati quattro geni (HCN 1-4) che codificano le subunità di diversi tipi di canali HCN, particolarmente diffusi in sistemi biologici eccitabili come neuroni e cellule del cuore.

## La corrente $I_h$

Quando i canali HCN si aprono permettono in maniera selettiva al  $\text{Na}^+$  e al  $\text{K}^+$  di fluire attraverso la membrana, generando così una corrente cationica. Le proprietà biofisiche di questa corrente sono state originariamente descritte nei cardiomiociti del nodo seno atriale (SAN) verso la fine degli anni '70, e successivamente a partire dai primi anni '80 correnti simili sono state identificate in un'ampia varietà di cellule neuronali e non. In letteratura questa corrente può essere designata con nomi differenti; in generale quando se ne discute il ruolo fisiologico nelle cellule del nodo seno atriale (SAN) e in altre cellule del cuore, il termine comunemente adottato è  $I_f$  (f sta per "funny"), mentre nel sistema nervoso centrale (SNC) viene preferenzialmente designata con il termine  $I_h$  (h sta per "hyperpolarization-activated"). I due termini  $I_f$  e  $I_h$  sono stati ispirati da una caratteristica abbastanza insolita di questa corrente; infatti al contrario della maggior parte delle conduttanze di membrana, questa corrente voltaggio-dipendente si attiva in iperpolarizzazione piuttosto che in depolarizzazione. La soglia di attivazione di questa corrente è in funzione del tipo cellulare neuronale o cardiaco che la esprime, e generalmente viene compresa in un range di potenziale tra i -65 e i -35 mV. Anche la voltaggio dipendenza può essere variabile, ma nella maggior parte delle cellule presenta valori di  $V_{1/2}$  compresi tra i -100 e i -70 mV.

L'ampiezza massima della corrente si ottiene per valori di potenziale molto negativo, intorno ai -110 mV (Fig 1A-B) (Biel *et Al.*, 2009). La conduttanza mista al  $\text{Na}^+$  e al  $\text{K}^+$ , mostrata dai canali HCN, produce un potenziale d'inversione della corrente di circa -20 mV, valore intermedio ai potenziali di equilibrio delle due specie ioniche permeanti (Fig 1C) (Biel *et Al.*, 2009). Inoltre i canali HCN, mostrano una diversa permeabilità ai due cationi, con un rapporto ( $\text{PNa}^+/\text{PK}^+$ ) di circa 1:3 (Pape, 1996). Nelle condizioni

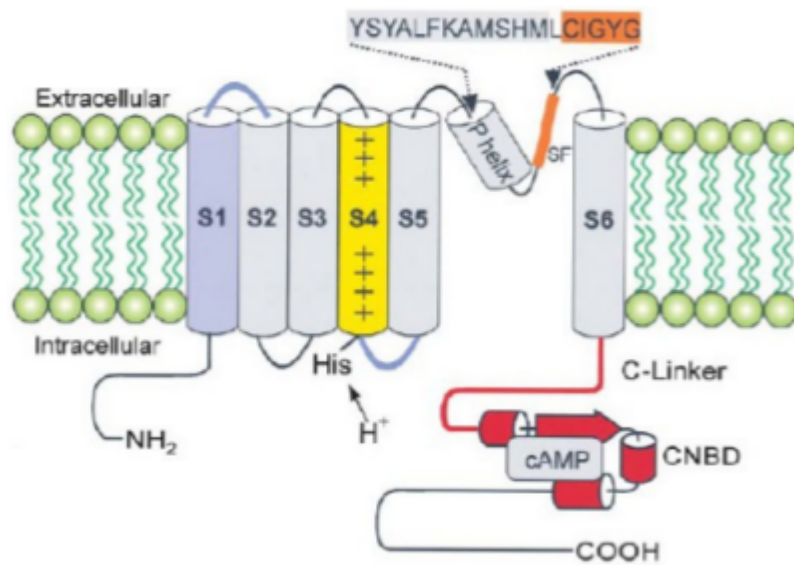
ioniche fisiologiche, l'effetto netto della conduttanza mista e della diversa permeabilità ai due cationi mostrato dai canali HCN, è quello di determinare una corrente netta entrante e depolarizzante nell'ambito dei voltaggi alla quale i canali si attivano. Altra peculiarità di questa corrente è quella di mostrare delle lente cinetiche di attivazione e deattivazione, con valori di costante di attivazione ( $\tau_{act}$ ) comprese tra i 100 ms e alcuni secondi; comunque correnti più veloci ( $\tau_{act}$  30-50 ms) sono state osservate nei neuroni ippocampali della regione CA1 (Robinson and Siegelbaum, 2003).

**A****B****C**

**Figura 1:** A) Esempio di una curva di attivazione della corrente  $I_h$  calcolata sui dati ricavati da sette cellule neuronali. I pallini pieni rappresentano i dati ottenuti dall'analisi della cellula del riquadro B. L'ampiezza della corrente dipende dal valore del potenziale e aumenta man mano che il potenziale diviene più negativo. L'ampiezza massima della corrente si ottiene per valori di potenziale attorno ai -110 mV. B) Tracce di corrente di una cellula neuronale ottenute applicando degli steps di potenziali iperpolarizzanti da -40 a -90 mV. (McCormick and Pape, 1990). C) Curva dose-risposta dello shift indotto dal secondo messaggero cAMP.

## Proprietà molecolari dei canali HCN

I canali HCN insieme ai canali CNG (Cyclic Nucleotide Gated) e ai canali EAG (“ether-a-go-go”) costituiscono il gruppo di canali regolati da nucleotidi ciclici all’interno della superfamiglia di canali del potassio attivati dal voltaggio (Kaupp UB and Seifert R., 2002). In tutti i mammiferi ad oggi investigati, sono state identificate quattro diverse isoforme delle proteine HCN (HCN1-4); nell’uomo i geni che codificano queste isoforme mappano su cromosomi diversi: HCN1: 5p12; HCN2: 19p13.3; HCN3: 1q22; HCN4: 15q24-25 (Vaccari *et Al.*, 1999). Omologhi dei geni HCN sono stati clonati nei vertebrati e in alcuni invertebrati, mentre sono assenti nei genomi di *C.elegans*, lievito e in generale dei procarioti (Biel *et Al.*, 2009). Le quattro isoforme sono considerate le unità strutturali dei canali HCN. Grazie agli studi derivanti dalla diffrazione ai raggi X delle proteine cristallizzate dei canali K<sup>v</sup> (Jiang *et Al.*, 2003; Long *et Al.*, 2005), omologhi dei canali HCN, è stato suggerito che anche il canale HCN attivo funzionalmente, sia in realtà un sistema costituito da un tetramero di unità proteiche HCN che si assemblano tridimensionalmente attorno ad una asse centrale di simmetria quaternaria. Le subunità si organizzano in modo costituire un poro centrale che permette il passaggio di ioni Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> attraverso la membrana. Ognuna delle quattro subunità può omotetramerizzare per formare il canale attivo, tuttavia ci sono evidenze che il numero potenziale di canali HCN può essere accresciuto dalla formazione di eterotetrameri. La struttura terziaria di ogni subunità HCN è contraddistinta principalmente da tre moduli strutturali: una regione transmembrana e le due estremità N e C terminali entrambe rivolte nell’ambiente acquoso intracellulare (Fig 2). Moltissimi studi sono stati condotti al fine di comprendere la relazione tra le proprietà funzionali dei canali HCN e la loro struttura molecolare.



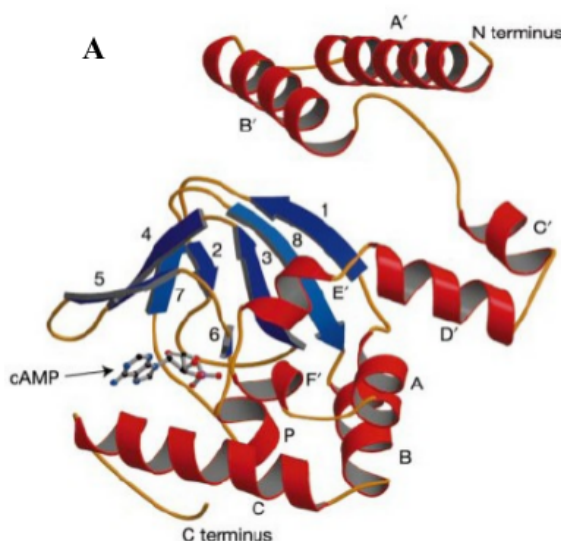
**Figura 2:** Rappresentazione schematica della struttura terziaria proposta per una subunità HCN. Ogni cilindro rappresenta una possibile  $\alpha$ -elica che attraversa la membrana. Al segmento S4 carico positivamente è stata attribuita la funzione di sensore del voltaggio. Tra i segmenti S5 e S6 è presente il segmento P che contiene il filtro di selettività. Sono rappresentati anche la regione N- e C-terminali, entrambi rivolte nel citoplasma. La regione C-terminale è molto più estesa rispetto alla regione N-terminale e contiene il dominio CNBD, responsabile dell'interazione fisica del canale con i nucleotidi ciclici.

Il dominio transmembrana ha un ruolo fondamentale: questo conferisce la capacità al canale di stabilizzarsi in membrana, condurre specie ioniche ed essere responsivo a variazioni del voltaggio. L'analisi del profilo idrofobico condotta sulla struttura primaria ha predetto la presenza di 6 segmenti idrofobici transmembrana (TM, S1-S6), strutturati come delle  $\alpha$ -eliche. Queste regioni sono a loro volta connesse da loop idrofilici disposti ad ansa, che si affacciano sia sul versante interno che esterno della cellula. A causa della loro natura prevalentemente idrofobica le eliche TM di ogni subunità, formano interazioni stabilizzanti con la componente apolare del bilayer lipidico, permettendo così al canale di stabilizzarsi in membrana. Parte dei segmenti S5, S6 e il tratto compreso fra questi detto segmento P, strutturano la parete del poro del canale. Il segmento P è costituito da una breve elica (elica del poro o P loop) che si approfonda in membrana e costituisce un tratto della parete del poro, e da un'ansa che contiene il filtro di selettività responsabile della selettività ionica dei canali HCN. Analogamente ai canali del potassio Kv, e conservato nelle 4 isoforme HCN, il filtro di selettività è costituito dalla tripletta GYG (glicina-tirosina-glicina). Tuttavia, rispetto ai canali Kv, i canali HCN non conducono esclusivamente ioni  $K^+$ , ma mostrano una permeabilità seppur minore anche al  $Na^+$ ; è stato suggerito che ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di amminoacidi diversi a valle del motivo GYG rispetto a quelli dei canali Kv, che probabilmente modificando la forma e la struttura del poro, possono influenzare la conduttività

del canale HCN (Kaupp and Seifert., 2001). Il segmento elicoidale S4 rappresenta la porzione del canale adibita a sensore del voltaggio. La capacità di questa struttura di rilevare i cambiamenti del potenziale elettrico in membrana, è dovuta alla presenza di aminoacidi carichi positivamente (2 lisine, 7 arginine e 2 istidine) opportunamente spazati ogni 3-4 aminoacidi idrofobici, che mantengono la carica positiva a pH fisiologico (Baruscotti *et Al.*, 2010). Nel caso dei canali HCN l'iperpolarizzazione della membrana, esercitando un'influenza elettrostatica sugli aminoacidi carichi positivamente, promuoverebbe un cambiamento di posizione dell'elica S4, che a sua volta influenzerebbe la struttura del canale facilitandone la transizione ad uno stato aperto. Per quanto riguarda la regione C-terminale, questo può essere distinto, rispetto al dominio TM, in una porzione prossimale e una distale.

La porzione citosolica C-terminale prossimale media la regolazione dei canali HCN da parte dei secondi messaggeri cAMP e cGMP. Questa regione è costituita da un dominio di legame ai nucleotidi ciclici (CNBD) costituito da circa 120 aa, e da una regione C-linker di circa 80 aa che connette il CNBD al segmento S6. È stata determinata la struttura cristallografica della regione C-linker-CNBD per HCN2 (Zagotta *et Al.*, 2003); il CNBD è strutturato in 3  $\alpha$ -eliche (A-B-C) e una struttura ad 8 foglietti antiparalleli  $\beta$ -roll ( $\beta$ 1- $\beta$ 8), mentre il C-linker è strutturalmente organizzato in 6  $\alpha$ -eliche (Fig. 2).

La tasca di legame per il cAMP si trova all'interfaccia tra la struttura  $\beta$ -roll e l'elica-C. All'interno di questa tasca 7 aminoacidi coordinano il legame del nucleotidico ciclico, 3 si trovano nella struttura  $\beta$ -roll (R591, T592, E582) e 4 sull'elica-C (R632, R635, I636, K638). Secondo un modello recente, è stato suggerito che in assenza di cAMP, il dominio a  $\beta$ -roll del CNBD, attraverso uno stretto legame con il C-linker, si comporti come un dominio strutturale autoinibitorio, che quindi limita la capacità del canale di aprirsi in risposta alle variazioni di voltaggio (Craven *et Al.*, 2006). Il legame del cAMP al CNBD, ne promuove variazioni conformazionali in grado di trasferirsi al



**Figura 3:** A struttura cristallina ottenuta ai raggi X del C-linker e del CNBD in complesso con il cAMP, della subunità HCN2 di topo. La struttura fondamentale del complesso è colorata in base alla sua struttura secondaria.

C-linker e da qui ad altre regioni del canale modificandone la struttura quaternaria; come risultato, viene rimossa la restrizione imposta dal CNBD-C-linker. In accordo con il modello, sperimentalmente è stato osservato che la delezione del CNBD simuli l'effetto modulatore del cAMP. Per quanto riguarda invece la porzione C-terminale a valle del dominio CNBD, questa può essere coinvolta nel legame di numerose proteine scaffold (TRBP8, Filmin A, Mint2, S-SCAM) che controllano il trafficking del canale attraverso la membrana e possono guidare l'espressione del canale in compartimenti subcellulari distinti, promuovendo in alcuni tipi cellulari una distribuzione non uniforme dei canali lungo la membrana (Biel *et Al.*, 2009). Infine, per quanto riguarda l'estremità N-terminale, studi evidenziano che possa avere un ruolo importante nel conferire la capacità alle subunità di tetramerizzare, requisito fondamentale per la generazione di canali attivi funzionalmente (Tran *et Al.*, 2002). L'analisi dei residui aminoacidici conservati, ha mostrato che le proteine HCN, mostrano elevati livelli di similarità (80-90%) nelle regioni delle proteine comprese tra il segmento S1 e il CNBD, mentre le principali differenze si hanno sia nella regione N-terminale che C-terminale a valle del CNBD. Se da un lato l'elevata similarità suggerisce che i geni che codificano le quattro proteine HCN, si possano essere evoluti da un gene ancestrale comune mediante eventi di duplicazione genica (Jackson *et Al.*, 2007), dall'altro le differenze molecolari che si osservano nelle due regioni terminali potrebbero spiegare in parte le diverse proprietà funzionali delle quattro isoforme.

## Modulazione della $I_h$

Come già accennato precedentemente, le proprietà biofisiche della corrente nativa  $I_h$  possono differire quantitativamente in funzione delle cellule che la esprimono. In parte questa variabilità è dovuta alla capacità delle cellule di esprimere in maniera differenziale diverse isoforme di canali HCN in membrana. Una volta identificati e clonati i geni, è stato possibile esprimere le quattro subunità HCN di mammifero in sistemi di espressione eterologa; gli esperimenti hanno mostrato che le diverse subunità possono coassemblare formando strutture sia omotetrameriche che eterotetrameriche, dando origine ad un'ampia varietà di isoforme di canali HCN, le cui proprietà funzionali (cinetica di attivazione, ambito del voltaggio entro cui si attivano, diversa sensibilità ai nucleotidi ciclici, sensibilità allo ione  $\text{Cs}^+$ ) sono in funzione delle isoforme che si combinano a strutturare il canale. Comparando le proprietà funzionali dei canali omotetramerici, questi studi indicano che all'interno della famiglia dei canali HCN, l'isoforma HCN1 mostra le cinetiche di attivazione e deattivazione più veloci (a  $-95\text{mV}$ ,  $\tau_{\text{on}} = 0.11\text{s}$ ), mentre



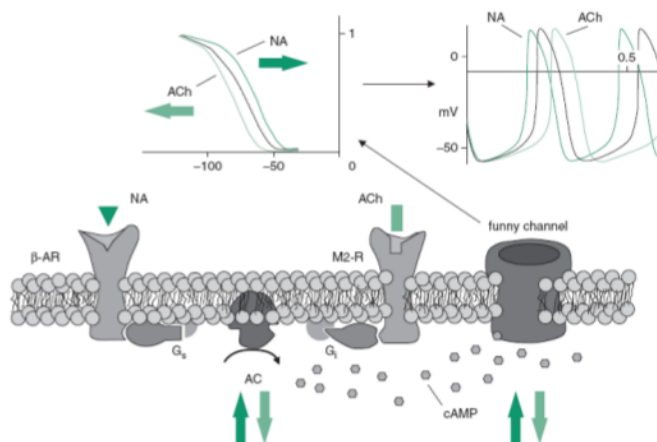
l'isoforma HCN4 presenta le cinetiche più lente (a -95mV,  $\tau_{on}$  =2,52s); le isoforme HCN2 e HCN3 presentano cinetiche intermedie, simili tra loro (rispettivamente: a -95mV,  $\tau_{on}$  =1.13 s; a -100mV,  $\tau_{on}$  =1.24 s (Moroni *et Al.*, 2001; Altomare *et Al.*, 2003). Per quanto riguarda la voltaggio-dipendenza, il potenziale di mezza attivazione ( $V_{1/2}$ ) delle 4 isoforme umane HCN1-HCN4 è rispettivamente di -69.5, -95.6, -77, -92 mV (Stieber *et Al.*, 2005), quindi HCN1 è l'isoforma che rispetto alle altre si attiva a potenziali più positivi. Anche per quanto riguarda la sensibilità al cAMP, le quattro isoforme si comportano in maniera differente. L'effetto più rilevante il cAMP lo esplica sulle isoforme HCN2 e HCN4, provocando uno shift di 10-20 mV della curva di attivazione verso valori positivi. Al contrario, HCN1 manifesta una ridotta sensibilità al cAMP, con uno shift di 5 mV (Moroni *et Al.*, 2001; Santoro B. *et Al.*, 1998). L'isoforma HCN3 sorprendentemente, risulta invece insensibile all'attività modulatoria del nucleotide ciclico (Mistrik *et Al.*, 2005; Stieber *et Al.*, 2005).

Per quanto riguarda invece le isoforme eterotetrameriche, questi canali mostrano proprietà funzionali intermedie tra quelle delle singole isoforme componenti (Chen *et Al.*, 2001; Altomare *et Al.*, 2003; Ishii *et Al.*, 2001; Xue *et Al.*, 2002; ). Comunque, il diverso numero di canali che possono essere generati assemblando subunità con proprietà funzionali differenti, non basta a spiegare le proprietà delle correnti  $I_h$  native. È stato dimostrato che le caratteristiche elettrofisiologiche della corrente  $I_h$  possono subire l'influenza modulatoria di altri sistemi che fanno parte del microambiente cellulare (legame di proteine accessorie, modificazioni post-traduzionali, interazioni con fosfolipidi di membrana, etc. etc).

Per esempio, studi dimostrano che modulazioni delle proprietà della corrente  $I_h$  possono essere indotte dall'innalzamento dei livelli intracellulari di fosfoinositidi, come il fosfoinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2) che è in grado di spostare la curva di attivazione di circa 20 mV verso valori più positivi. Questo meccanismo di regolazione opera in maniera indipendente dall'azione dei nucleotidi ciclici, è mostra effetti quantitativamente simili sulle isoforme HCN1-2-4 (Zolles *et Al.*, 2006). Tuttavia, al momento non è ancora chiaro quale sia la dinamica delle interazioni molecolari tra i canali HCN e il PIP2. Le cinetiche di conduzione dei canali HCN possono essere influenzate anche dal legame diretto con altre proteine. Alcuni studi hanno identificato nella proteina Mirp-1 (MINK-related-peptide-1) una possibile subunità accessoria che coassembla con i canali HCN 1-2-4 e ne modifica le proprietà di conduzione (Qu J *et Al.*, 2004; Yu H *et Al.*, 2001). È stata inoltre dimostrata una regolazione della corrente  $I_h$  da parte della fosforilazione; è stato evidenziato che, nel canale HCN4 espresso in cellule HEK293, la fosforilazione, mediata da Src, di una tirosina presente a livello del C-terminale, modula la probabilità di apertura del canale verso potenziali più positivi e ne velocizza l'attivazione, influenzando così le proprietà del canale (Arinsburg *et Al.*, 2006). Questa tirosina è conservata in tutte e quattro le isoforme suggerendo che la regolazione da parte della chinasi Src può essere comune a tutte le isoforme dei canali HCN.

Oltre a generare l'attività spontanea caratteristica delle cellule pacemaker, la corrente  $I_f$  ha un ruolo

fondamentale nella modulazione del ritmo cardiaco attraverso l'azione dei neurotrasmettitori del sistema nervoso autonomo. La stimolazione simpatica aumenta la frequenza cardiaca mentre quella parasimpatica la diminuisce. Il principale meccanismo di regolazione del canale  $f$  coinvolge il nucleotide ciclico adenosin-monofosfato (AMPC); esso agisce sul canale mediante un'interazione diretta (DiFrancesco & Tortora, 1991) che provoca un aumento della probabilità di apertura del canale stesso senza alterarne la conduttanza (Di Francesco & Mangoni, 1994). Tale modulazione è molto importante nel meccanismo di regolazione della frequenza cardiaca da parte del sistema nervoso autonomo. In particolare, le fibre simpatiche rilasciano noradrenalina la cui interazione con i recettori  $\beta$ -adrenergici, accoppiati a G-proteine stimolatorie, determina un aumento dei livelli di cAMP intracellulari attraverso la stimolazione dell'adenilato-ciclasi. Questo evento comporta uno spostamento della curva di attivazione della corrente  $I_f$  verso potenziali più positivi (DiFrancesco *et Al.*, 1986; DiFrancesco & Mangoni, 1994). L'effetto risultante è un aumento della pendenza della fase di depolarizzazione diastolica lenta che si traduce in un aumento del ritmo sinusale (effetto cronotropo positivo). Gli agonisti muscarinici hanno invece un effetto opposto (cronotropo negativo). Le terminazioni vagali parasimpatiche rilasciano acetilcolina la cui interazione con i recettori M2 muscarinici, accoppiati a G-proteine inibitorie, causa una inibizione dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione della sintesi di cAMP. La curva di attivazione della corrente  $I_f$  viene di conseguenza spostata verso potenziali più negativi con conseguente diminuzione della pendenza della fase pacemaker ed effetto cronotropo negativo. Studi sulla modulazione simpatica e parasimpatica della frequenza di scarica delle cellule senoatriali hanno inoltre evidenziato che a basse concentrazioni ( $0.001-0.01 \mu M$ ) i neurotrasmettitori sono in grado di agire solo sulla corrente  $I_f$  determinando esclusivamente dei cambiamenti nella pendenza della fase pacemaker (DiFrancesco *et Al.*, 1989; Zaza *et Al.*, 1996; Wainger *et Al.*, 2001). Questi risultati indicano che l'azione del sistema nervoso autonomo si svolge attraverso due distinti meccanismi che possono essere utilizzati per regolare la frequenza in diverse condizioni. Grazie a questo duplice meccanismo di modulazione è possibile ottenere, attraverso il rilascio di piccole quantità di neurotrasmettitore e la modulazione della corrente  $I_f$ , una fine regolazione della frequenza cardiaca. Le proprietà intrinseche della corrente  $I_f$  fanno quindi di essa la principale candidata nel ricoprire un ruolo di primaria importanza nella genesi e nella modulazione della frequenza cardiaca.



**Figura 4:** Modulazione del canale *funny* da parte dell'AMP ciclico (AMPc): vie di trasduzione del segnale accoppiate al recettore  $\beta$ -adrenergico ( $\beta$ -AR) e al recettore muscarinico (M2-R) che determinano la variazione dei livelli di AMPc e, di conseguenza, la modulazione del canale pacemaker nei miociti senoatriali. ACh, acetilcolina; NA, noradrenalina; AC, adenilato-ciclasi; Gi, G-protein inibitoria; Gs, G-protein stimolatoria. (Da DiFrancesco and Borer. 2007)

## Espressione fisiologica dei canali HCN

Mediante l'ausilio di tecniche d'indagine come l'analisi Northern Blot, RNase Protection Assay, l'ibridazione *in situ* e tecniche immunoistochimiche, il profilo di espressione fisiologica sia dei trascritti che delle proteine HCN, è stato estesamente indagato da molti gruppi di ricerca; le indagini sono state effettuate su vari modelli animali (topo, ratto e coniglio). In generale, tali studi hanno mostrato che i geni *HCN* sono particolarmente espressi in tessuti eccitabili come il cuore e il SNC. Nel SNC, gli esperimenti mostrano che le modalità di distribuzione delle quattro isoforme HCN possono variare ampiamente non solo da cellula a cellula, ma in alcuni casi anche da una regione all'altra della stessa cellula; pertanto questa diversa distribuzione può contribuire alla specializzazione funzionale delle diverse componenti nervose. Per quanto riguarda l'isoforma HCN1 le analisi Northern e l'ibridazione *in situ* rilevano una marcata presenza del suo trascritto nell'ippocampo, nella neocorteccia, nella corteccia cerebellare e nel tronco encefalico (Moosmang *et Al.*, 1999; Santoro B *et Al.*, 2000). L'analisi con anticorpi specifici mostra che nell'ippocampo, la proteina HCN1 localizza preferenzialmente nei neuroni piramidali della regione CA1, mentre nella corteccia cerebellare l'isoforma HCN1 si localizza preferenzialmente nei terminali delle cellule del canestro che innervano le cellule del Purkinje. La presenza della proteina HCN1 è stata rilevata anche nei bastoncelli di retina di coniglio (Demontis *et Al.*, 2001).

HCN2 diversamente da HCN1 e dalle altre subunità, viene espressa ubiquitariamente in quasi tutte le regioni del SNC, anche se l'espressione più alta viene riportata nel talamo, nel tronco encefalico e nell'ippocampo (Biel M *et Al.*, 2009). Al contrario, la subunità HCN3 viene espressa nel SNC a livelli molto bassi, un'espressione moderatamente alta è stata rilevata nei nuclei ipotalamici e nel bulbo olfattorio (Moosmang S. *et Al.*, 1999). Infine l'isoforma HCN4; questa è fortemente espressa in alcune regioni del cervello, come in vari nuclei talamici e nello strato di cellule mitrali del bulbo olfattivo; nelle altre regioni cerebrali viene invece espressa a bassi livelli (Moosmang *et Al.*, 1999; Notomi *et Al.*, 2004). Anche nel tessuto cardiaco tutte e quattro le isoforme sono state investigate. I dati di espressione ottenuti dai diversi modelli animali, mostrano che analogamente a quanto si verifica nel SNC, anche nel cuore le quattro isoforme HCN, mostrano un pattern di distribuzione caratteristico a seconda delle diverse regioni cardiache considerate. Nel SAN, in tutte le specie considerate l'isoforma più abbondante è HCN4, che costituisce l'80 % della corrente *I<sub>f</sub>* totale. La rimanente frazione di corrente è dipendente dalla specie considerata; nel coniglio è dovuta alla subunità HCN1, mentre nel topo e nell'uomo è dovuta alla subunità HCN2. HCN4 è l'isoforma predominante anche nel nodo atrioventricolare e nelle fibre del Purkinje. Per quanto riguarda HCN2, nel cuore i tessuti in cui è maggiormente riscontrabile sono quello atriale e quello

ventricolare (Shi *et Al.*, 1999; Moosmang *et Al.*, 2001).

## **Ruolo delle correnti condotte dai canali HCN**

### **nell'eccitabilità cellulare**

La corrente  $I_h$  mostra un set di caratteristiche biofisiche che sono essenziali per il controllo dell'eccitabilità e la responsività elettrica delle cellule che la esprimono. Per quanto concerne questi ruoli fisiologici, due proprietà della corrente assumono particolare rilevanza: il contributo nella generazione del potenziale di riposo (VR), e la capacità di rendere alcune cellule che la esprimono, cellule “*pacemaker*”.

### **Contributo della corrente $I_h$ alla generazione del VR**

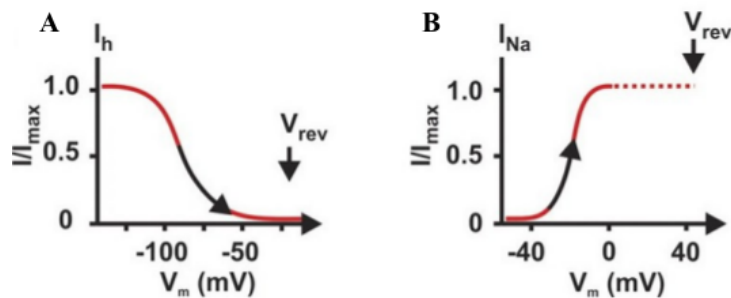
A causa dell'elevata permeabilità cellulare, in molti neuroni lo ione  $K^+$ , fornisce il più importante contributo alla generazione del (VR). Tuttavia, il VR nella maggior parte delle cellule nervose è più positivo rispetto al valore del potenziale di equilibrio per il  $K^+$  ( $\sim -75$  mV) e ciò è dovuto all'esistenza di correnti depolarizzanti che contribuiscono alla determinazione del VR, contrastando parzialmente l'effetto iperpolarizzante imposto dall'elevata conduttanza della membrana al  $K^+$ . Tra queste correnti un ruolo importante viene spesso giocato dalla corrente  $I_h$  in quanto, in molti neuroni il VR è mantenuto entro valori di voltaggio che permettono l'attivazione costitutiva, seppur parziale, dei canali HCN. Evidenze sperimentali che dimostrano l'importanza della corrente nella generazione del VR sono state ottenute mediante un approccio farmacologico. Applicando lo ione  $Cs^+$  (bloccante della corrente  $I_h$ ) ai neuroni a riposo si osserva infatti un'iperpolarizzazione del potenziale di membrana (Maccaferri *et Al.*,1993 ; McCormick *et Al.*,1990 ) e ciò indica la rimozione di un contributo  $I_h$  dipendente depolarizzante.

Il coinvolgimento della corrente  $I_h$  nella generazione del VR ha delle conseguenze. Innanzitutto, i canali HCN, aperti costitutivamente a riposo, *stabilizzano il VR abbassando la resistenza d'ingresso della membrana* (RM). L' RM viene definita come il rapporto tra la variazione del voltaggio e la corrente richiesta per realizzarla e in ogni cellula questo valore è un indice del numero di canali che sono aperti al potenziale di riposo. Gli esperimenti dimostrano che i neuroni privati della  $I_h$  aumentano la propria RM, questo vuole quindi dire che, ogni ingresso di corrente in cellula sarà in grado di evocare una maggiore variazione del potenziale di membrana rispetto alla situazione opposta, in cui la  $I_h$  è presente (Pape HC., 1994). In questo modo, di fatto la corrente riduce l'eccitabilità della cellula, divenendo un valido strumento nel contrastare fluttuazioni a bassa frequenza del potenziale di membrana, che possono essere

dovuti a disturbi di vario genere come per esempio variazioni nell'omeostasi del potassio, variazioni di temperatura e pH . Comunque, il maggior contributo nel prevenire le oscillazioni del VR da parte della  $I_h$  viene attribuita all'insolita relazione tra la sua curva di attivazione e il valore del suo potenziale di equilibrio. Al contrario dei canali del  $Ca^{2+}$  e del  $Na^+$  voltaggio-dipendenti che sono massimamente attivati al loro potenziale di equilibrio, il potenziale di equilibrio della corrente  $I_h$  si trova alla base della curva che descrive la sua dipendenza dal voltaggio (Fig 5A-B) (Hutcheon B *et Al.*, 2000). Quando i canali HCN si aprono, la corrente depolarizzante che producono spinge il potenziale di membrana verso il potenziale di equilibrio della  $I_h$ , a valori di potenziale più positivi, dove la probabilità di apertura del canale si riduce.

Questa caratteristica abbastanza insolita, dota la  $I_h$  di un'intrinseca attività a *feed-back* negativo, che è alla base della capacità di questa corrente di essere molto efficace nel contrastare attivamente oscillazioni del VR prodotte da input di depolarizzazione e iperpolarizzazione. Abbiamo già detto che al VR, generalmente solo una frazione della conduttanza massima della  $I_h$  è attiva, d'altro canto l'incompleta attivazione risulta in una riserva funzionale di canali che possono essere attivati. Se la membrana viene iperpolarizzata aumenta la frazione di canali HCN aperti, questo effetto produce una corrente depolarizzante più intensa in grado di contrastare l'iperpolarizzazione, trascinando il potenziale di membrana verso il potenziale d'equilibrio della  $I_h$ , tuttavia per valori vicini a questo, i canali HCN iniziano a deattivarsi, e in tal modo verrà ristabilita la situazione iniziale di equilibrio. Al contrario, un ingresso di corrente depolarizzante spostando il VR verso valori più positivi, farà diminuire il numero di canali HCN che erano aperti a riposo; la risultante riduzione in ampiezza della  $I_h$ , ha lo stesso effetto di produrre una corrente iperpolarizzante che riporta di nuovo il potenziale al valore di riposo (Biel *et Al.*, 2009). Un'altra conseguenza del coinvolgimento della  $I_h$  nella generazione del VR è che, al contrario di quanto discusso sino ad adesso, le proprietà della  $I_h$  possono essere sfruttate dai neuroni anche come fattore che rende più flessibile l'eccitabilità di membrana. L'eccitabilità di una cellula varia in funzione del VR, che è un indice della differenza di voltaggio richiesta per raggiungere il valore soglia, che permette alla cellula di generare potenziali d'azione. Questo vuol dire che la cellula evocherà potenziali d'azione solo se l'integrazione tra stimoli eccitatori ed inibitori che avviene sulla sua superficie, è in grado di colmare la differenza di voltaggio che sussiste tra il VR e il potenziale soglia. La  $I_h$  può influenzare il valore di VR e di conseguenza rendere la membrana dei neuroni che la esprimono più eccitabile. Questa capacità della corrente prende in considerazione non solo le sue caratteristiche di voltaggio-dipendenza ma anche la sua intrinseca proprietà di essere modulata dal secondo messaggero cAMP (McCormick *et Al.*, 1990). Un aumento transitorio della concentrazione intracellulare di cAMP sposta verso valori più positivi la curva di attivazione della corrente  $I_h$ , in tal modo al valore del VR, il numero dei canali HCN nello stato aperto viene incrementato; questo produce come effetto l'aumento

dell'ampiezza della corrente che fa sì che il potenziale di membrana si attesti su un nuovo VR più positivo rispetto al precedente, diminuendo così la differenza di voltaggio tra il VR e il potenziale soglia, e di fatto permettendo anche a stimoli di minore intensità di promuovere l'insorgenza di un potenziale d'azione. Questa capacità della conduttanza di rendere più eccitabile una cellula oltre che dall'interazione con i nucleotidi ciclici dipenderà principalmente dalla posizione e dalla forma che la sua curva di attivazione assume nel contesto fisiologico cellulare. Infatti, dato che la relazione tra la probabilità di apertura dei canali HCN e il voltaggio di membrana assume le sembianze di una curva sigmoidale, questa sarà caratterizzata da una regione centrale più ripida, che in molte cellule comprende valori di voltaggio prossimi al VR; in questi casi quindi è possibile che anche piccoli spostamenti della curva di voltaggio dipendenza della corrente verso valori più positivi, possono tradursi in notevoli variazioni della sua ampiezza. Al contrario, per valori del VR che comprendono le due porzioni di curva dove la pendenza è meno ripida, anche notevoli spostamenti della curva di dipendenza dal voltaggio sono associate a minime variazioni nell'ampiezza della corrente.



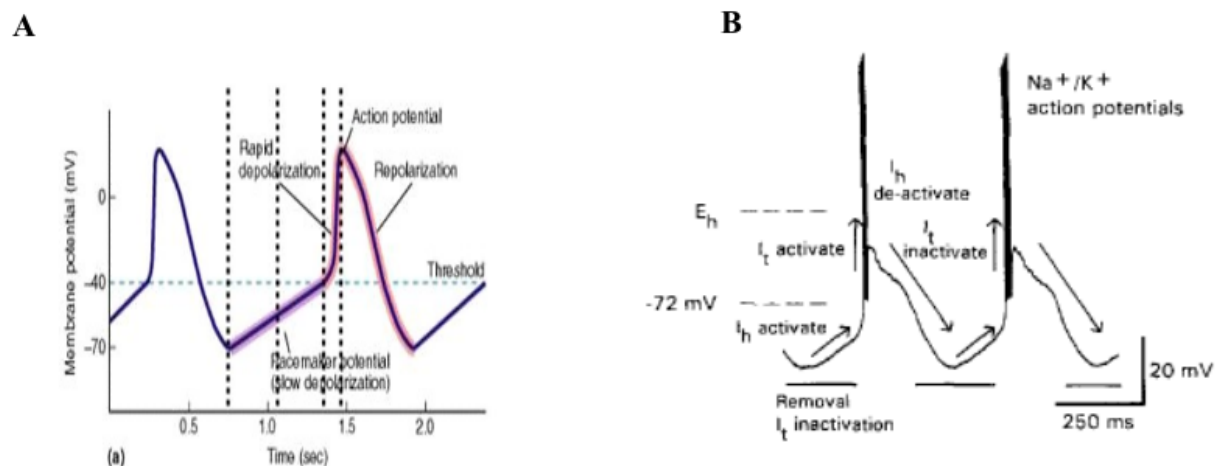
**Figura 5.** A) Il potenziale d'inversione della corrente  $I_h$  cade alla base della curva di attivazione. Una parziale attivazione della corrente guida il potenziale di membrana verso il potenziale d'inversione alla base della curva. In questo modo si verifica una auto-inibizione da parte della corrente  $I_h$  al fine di stabilizzare il potenziale di membrana. B) Esempio di corrente voltaggio-dipendente ( $I_{Na}$ ) che ha potenziale d'inversione all'apice della curva di attivazione. (Biel et Al., 2009).



## Contributo della corrente $I_h$ alla ritmogenesi

La natura unica della  $I_h$  di essere una corrente depolarizzante in grado di attivarsi in iperpolarizzazione conferisce ad alcune cellule proprietà funzionali particolari, come quella di essere dotate di attività spontanea; ciò vuol dire che, in assenza di qualsiasi stimolo esterno, queste cellule sono in grado di generare potenziali d'azione spontanei (automatismo), acquisendo di fatto il fenotipo di cellule pacemaker. Questa funzione può essere meglio compresa, divergendo brevemente sul ruolo che i canali HCN assumono nel controllo della ritmicità cardiaca; si ricorda che nel cuore la  $I_h$  è meglio conosciuta come  $I_f$ . L'automatismo del battito cardiaco è dovuto alla presenza delle cellule pacemaker del SAN. Queste cellule generano potenziali d'azione (Fig.6A) che al termine della ripolarizzazione non presentano un potenziale di riposo stabile, ma sono caratterizzati, dalla presenza di una fase di depolarizzazione diastolica lenta o fase pacemaker, compresa tra i -65 e -40 mV. Durante la fase pacemaker avviene una depolarizzazione spontanea della membrana fino a raggiungere il valore soglia (ca -40 mV) necessario per l'attivazione delle correnti di calcio di tipo L e T, che permettono la generazione di un nuovo potenziale d'azione. La depolarizzazione pacemaker è sostenuta da diverse correnti depolarizzanti, tra le quali la  $I_f$  assume un ruolo fondamentale. Infatti, dato che nel SAN la  $I_f$  ha una soglia di attivazione attorno ai -35/-40 mV, e metà dei canali sono aperti per valori di voltaggio compresi tra -65 e -70 mV, tale corrente è considerata la responsabile dell'inizio della fase della depolarizzazione lenta (DiFrancesco, 1986). Oltre all'importanza che la  $I_f$  assume nella generazione della fase pacemaker, e quindi nel controllo dell'automatismo cardiaco, essa ricopre un ruolo importante anche nella regolazione della frequenza del battito cardiaco ad opera del sistema nervoso autonomo (SNA). La stimolazione simpatica dei recettori  $\beta$ -adrenergici sulle cellule del SAN causa un aumento intracellulare del cAMP, e quindi una maggiore attivazione della  $I_f$ ; al contrario, la stimolazione dei recettori muscarinici M2 da parte della branca parasimpatica causa una diminuzione del cAMP, modulando negativamente la corrente (DiFrancesco, 1986; DiFrancesco & Mangoni, 1994). In questo modo il SNA può modulare le proprietà della corrente  $I_f$  e influenzare la pendenza della depolarizzazione diastolica: tanto più questa è ripida tanto prima verrà raggiunto il valore soglia e verrà innescato il successivo potenziale d'azione. Oscillazioni sincronizzate e ritmiche dei potenziali di membrana sono tipiche anche di un ampio numero di neuroni del SNC (Kandel *et Al.*, 2003). Analogamente a quanto avviene nelle cellule del SAN un contributo importante della  $I_h$  nell'attività ritmica delle cellule nervose è stato descritto nel talamo, in particolare nei neuroni della proiezione talamocorticale. Queste cellule, in assenza di qualsiasi afferenza sinaptica, sono in grado di scaricare spontaneamente brevi raffiche di potenziali d'azione che si succedono ritmicamente nel tempo (Fig.6B). Questo caratteristico profilo di scarica è dovuto all'azione concertata della  $I_h$  e di una

corrente entrante (detta  $I_t$ ), che passa attraverso canali del calcio voltaggio-dipendenti ( $CaT$ ) che hanno la proprietà di attivarsi a livelli relativamente bassi di depolarizzazione (McCormick and Bal, 1997). Come descritto precedentemente nel SAN, anche in questi neuroni la  $I_h$ , data la sua capacità di attivarsi in iperpolarizzazione, sostiene la generazione della fase di depolarizzazione lenta che accompagna il potenziale di membrana al valore soglia che fa aprire i canali  $CaT$ . L'ingresso notevole e prolungato della corrente di calcio rende più ripida la fase di depolarizzazione, permettendo il raggiungimento del valore soglia che innesca un treno di potenziali d'azione sodio dipendenti. Successivamente la depolarizzazione prodotta durante la generazione dei potenziali d'azione provoca l'inattivazione dei  $CaT$  e fa chiudere i canali HCN. Quindi, l'iperpolarizzazione che fa seguito al treno di potenziali d'azione toglie i canali  $CaT$  dallo stato di inattivazione e fa riaprire i canali HCN dando inizio ad un ciclo successivo del ritmo (McCormick and Huguenard, 1992). Il Talamo rappresenta la principale stazione di stimoli in entrata e in uscita dalla corteccia e si pensa che questa attività oscillatoria dei neuroni talamici rappresenti una sorta di meccanismo di controllo (McCormick and Bal, 1997).



**Figura 6:** potenziali d'azione caratteristici delle cellule del SAN (A) e dei neuroni della proiezione talamo-corticale (B).

## Canali HCN ed epilessia

Considerando la vasta espressione ed il ruolo che i canali HCN rivestono nella fisiologia dell'eccitabilità dei neuroni, è lecito ipotizzare che disfunzioni nelle loro proprietà possano favorire l'insorgenza di alcune forme di epilessia. Quindi, la ricerca di mutazioni dei geni hHCN in varie forme di epilessie umane rappresenta una nuova frontiera nell'ambito delle canalopatie e ricerche in tal senso coinvolgono diversi gruppi di ricerca; tuttavia, al momento la ricerca genetica ha individuato solo recentissimamente una mutazione epilettogena in un canale HCN. La mutazione E515K (mappata nel C-linker del canale hHCN2) è stata riscontrata in omozigosi in un paziente con epilessia idiopatica generalizzata. L'analisi funzionale ha permesso di concludere che tale variante, in omozigosi, si comporta come una mutazione *loss-of-function*, simulando il *knock-out* del gene HCN2 (DiFrancesco *et Al.*, 2011). Questa rappresenta la prima conferma delle ipotesi sul ruolo che questi canali possono avere nello sviluppo di epilessie di tipo monogenico, sia poligenico (Tang *et Al.*, 2007; Dibbens *et Al.*, 2010).

Infatti la relazione tra alterate proprietà della  $I_h$  e lo sviluppo di alcune forme di epilessia viene supportata da numerose altre evidenze sperimentali; la maggior parte di queste sono state ottenute da ricerche condotte su modelli animali nei quali era possibile indurre un accesso epilettico mediante l'iniezione di agenti anticonvulsanti o stimolazione elettrica focale. I dati ottenuti indicano che alterazioni nell'espressione e nella funzione dei canali HCN possono essere associati alla presenza di alcune forme di epilessia. In modelli animali (ratti) di epilessia febbrile, la down-regolazione di HCN1 e l'up-regolazione di HCN2 sono stati osservati nei neuroni piramidali ippocampali della regione CA1, in seguito allo scatenarsi dell'evento epilettico (Chen *et Al.*, 2001). La variazione dell'espressione delle due isoforme modifica le proprietà della  $I_h$ , che mostra una più lenta cinetica di attivazione e uno shift della curva di attivazione verso valori più positivi. Queste alterate proprietà della  $I_h$ , sono associate con l'aumentata probabilità di "firing" dei neuroni ippocampali in risposta a stimoli iperpolarizzanti alle normali frequenze fisiologiche (Brewster *et Al.*, 2002). Quindi, questi dati indicano che variazioni trascrizionali dei geni che codificano isoforme HCN1 e HCN2 possono essere associate a questa forma di epilessia. Un'alterata espressione dei canali HCN è stata evidenziata anche in un'altra forma di epilessia, l' "assenza" (*absence epilepsy*). La generazione delle scariche punte-onde, caratteristiche dell'assenza correlano con un incremento dell'attività oscillatoria del circuito talamocorticale. Visto il ruolo importante che i canali HCN assumono nella generazione di queste oscillazioni, una loro alterata espressione potrebbe contribuire all'evoluzione di questo particolare stato epilettico. A sostegno di questa

ipotesi in due modelli di ratto, (GAERS, WAG/Rij), particolarmente utili nell'investigare i meccanismi talamo-corticali nella generazione dell'epilessia da assenza, mostrano che i livelli di espressione di HCN1 nei neuroni talamo-corticali sono incrementati, mentre l'espressione delle altre isoforme è inalterata (Budde T *et Al.*, 2005; Kuisle M *et Al.*, 2006; Strauss *et Al.*, 2004). In entrambi i modelli la *I<sub>h</sub>* mostra una ridotta sensibilità al cAMP giustificata dall'aumento dei livelli di espressione di HCN1 rispetto HCN2. Il legame tra la *I<sub>h</sub>* e lo sviluppo dell'assenza è rafforzato dall'osservazione che topi deleti del gene HCN2 mostrano le caratteristiche scariche punta-onda (derivanti dal tracciato elettroencefalografico), tipiche di questa forma di epilessia. I neuroni talamo-corticali dei topi KO per HCN2 rispetto ai wt mostrano una riduzione della *I<sub>h</sub>* di circa l'80%, rivelando che HCN2 fornisce il maggior contributo alla generazione della *I<sub>h</sub>* talamo-corticale (Ludwing *et Al.*, 2003). La down-regolazione di HCN1 è stata anche osservata nei modelli murini di epilessia dei lobi temporali (TLE) indotta da acido kainico (Shah *et Al.*, 2004). I neuroni della corteccia entorinale (CE) di questi topi mostrano una maggiore eccitabilità. In questi neuroni le registrazioni elettrofisiologiche evidenziano una diminuzione della *I<sub>h</sub>* dovuta ad un decremento nei livelli di espressione delle subunità HCN1 e HCN2. L'iper-eccitabilità di questi neuroni potrebbe essere giustificata dal ruolo che la *I<sub>h</sub>* riveste nel controllo dei processi di integrazione dendritica. La diminuita espressione dei canali HCN in membrana, si traduce in un aumentata RM a livello dei dendriti aumentando così la capacità di questi neuroni di integrare potenziali post sinaptici eccitatori (EPSPs) e generare più facilmente potenziali d'azione.

## Canali HCN e disturbi del ritmo cardiaco

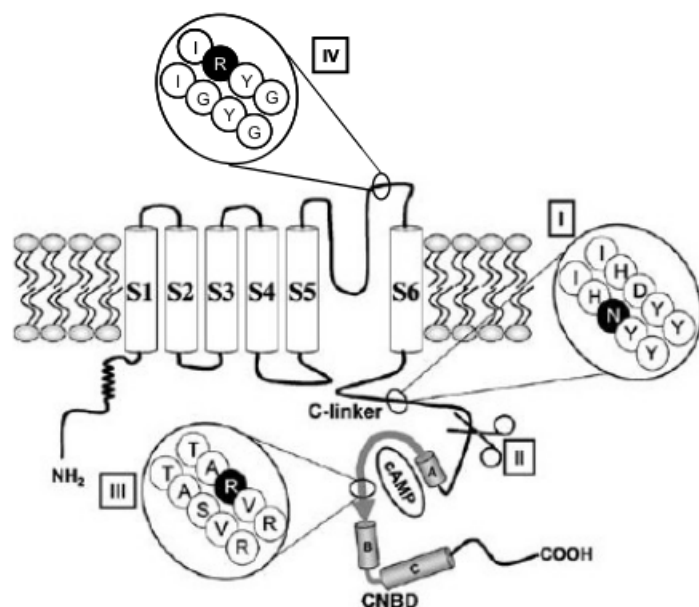
L'isoforma principalmente espressa nel nodo del seno umano è HCN4. In un lavoro recente, Altomare e collaboratori hanno effettuato una analisi completa della presenza e della distribuzione della proteina HCN4 nel NSA in un modello animale evidenziando una correlazione tra i livelli di espressione della proteina HCN4 e l'attività pacemaker (Altomare *et Al.*, 2003). In particolare, come dimostrato tramite esperimenti di immunofluorescenza e di elettrofisiologia, l'espressione della proteina HCN4 è maggiore nella regione corrispondente alla porzione centrale del NSA mentre risulta meno abbondante man mano che ci si sposta verso la periferia. Questi risultati, in unione con il fatto che l'isoforma HCN4 risulta abbondantemente presente **anche nel NSA nell'uomo**, possono fare concludere che questa proteina costituisce un marker molecolare delle cellule pacemaker del NSA. L'identificazione dei costituenti molecolari della corrente pacemaker (Santoro *et Al.*, 1998, Ludwig *et Al.*, 1999) ed in particolare di HCN4 ha portato quindi ad ipotizzare che la presenza di mutazioni nella sequenza codificante di questo gene contribuisce, direttamente o indirettamente, allo sviluppo di quelle particolari forme di alterazioni del ritmo con causa non ancora identificata. Il gene codificante per il canale HCN4 umano è stato identificato e clonato nel 1999 da Siefert e collaboratori. Esso è localizzato sul cromosoma 15q24-q25.

La prima mutazione del gene hHCN4 associata ad aritmia è stata descritta da Schulze-Bahr e collaboratori nel 2003 mentre ad oggi sono state identificate ed ampiamente caratterizzate un totale di quattro diverse mutazioni nella sequenza codificante del gene hHCN4. (Schulze-Bahr *et Al.*, 2003; Ueda *et Al.*, 2004; Milanesi *et Al.*, 2006). Il primo lavoro riporta il caso di una delezione di una singola base nell'esone 5 del gene hHCN4 (1631delC) in un paziente affetto da disfunzione idiopatica del nodo del seno con estrema bradicardia sinusale (41bpm), sincopi, fibrillazione atriale ed insufficienza cronotropa (Schulze-Bahr *et Al.*, 2003). Tale mutazione provoca la traduzione di una proteina "tronca", in cui viene a mancare il sito di legame per i nucleotidi ciclici (CNBD) (Fig. 7.II). L'espressione eterologa dimostrò che il canale mutato è insensibile al cAMP e presenta una cinetica di deattivazione alterata, caratteristiche che spiegherebbero rispettivamente l'insufficienza cronotropa e la bradicardia sinusale. Entrambi gli effetti sono dominanti negativi. L'ereditarietà di questa mutazione non è stata purtroppo indagata. Nel secondo lavoro Ueda e collaboratori hanno identificato, in un paziente soggetto a sincopi ricorrenti, estrema bradicardia (39bpm), QT-lungo e tachicardia ventricolare polimorfica, una mutazione puntiforme di tipo missenso (D553N) a livello della regione C-linker del gene hHCN4 (fig. 7.I). Questa mutazione, identificata anche in tre familiari, dà origine ad un difetto di "trafficking" del canale sulla membrana cellulare e quindi ad una significativa diminuzione della densità di corrente *I<sub>f</sub>* in questi soggetti. Tuttavia,

anche in questo caso, le proprietà dei canali mutati evidenziati dalle analisi in vitro risultano difficilmente correlabili con il complesso quadro clinico del paziente. In particolare, mentre la diminuzione della densità di corrente, sia per la 1631delC che per la D553N, è compatibile con la bradicardia dei soggetti in esame la stessa diminuzione non spiega facilmente sincope, fibrillazione atriale, QT-lungo e tachicardia ventricolare polimorfica. Recentemente, uno screening di popolazione in pazienti con alterazioni del ritmo ha portato all'identificazione di una mutazione puntiforme del gene hHCN4 strettamente correlata ad una forma di bradicardia asintomatica familiare (Milanesi *et Al.*, 2006) secondo una trasmissione di carattere autosomico dominante. Il gene mutato codifica per una proteina con una singola sostituzione aminoacidica nelCNBD (S627R) vicino al sito di legame dell' AMP ciclico (fig. 7.III). Tutti i 27 membri della famiglia sono stati analizzati per determinare la frequenza cardiaca e per verificare la presenza della mutazione. La frequenza cardiaca media degli individui portatori era di  $52.2 \pm 1.4$  bpm (n=15), mentre quella degli individui wild-type era di  $73.2 \pm 1.6$  bpm (n=12). Nonostante la mutazione si trovi in una regione altamente conservata del dominio CNBD, questa determina uno spostamento della curva di attivazione del canale verso voltaggi più negativi rispetto al wild type ( $-4.9$  mV negli esperimenti di co-espressione dei canali mutati e wild-type con un effetto dominante), ma senza compromettere la modulazione indotta dal cAMP. Lo spostamento della curva verso sinistra mima gli effetti di una debole stimolazione vagale e di conseguenza diminuisce la corrente entrante che porta a una depolarizzazione diastolica più lenta, che si manifesta in bradicardia. Un'altra relazione diretta tra una mutazione del gene hHCN4 e presenza di una forte bradicardia è stata identificata da Nof e collaboratori nel 2007 dove, in una famiglia di 8 individui, viene riportata la presenza della mutazione G480R nella regione codificante il poro della proteina. A livello clinico viene evidenziato il fatto che tutti gli individui portatori della mutazione (n=8) presentano una marcata bradicardia asintomatica ( $<55$  bpm) mentre gli individui wild-type presentano una frequenza media  $>63$  bpm.

Purtroppo, la presenza di altri disturbi quali incompetenza cronotropa, sincopi, disturbi del ritmo o di conduzione non viene specificata. Esperimenti di espressione in cellule HEK293 hanno dimostrato che i canali mutati si attivano a voltaggi più negativi e presentano difetti di sintesi e "trafficking" con conseguente diminuzione del contributo della corrente  $I_f$  durante la fase di depolarizzazione diastolica. Tutti questi studi sulle canalopatie correlate al gene hHCN4 confermano il contributo di questo nella generazione del ritmo cardiaco fisiologico ed evidenziano il fatto che la diminuzione della corrente  $I_f$  è direttamente coinvolta nello sviluppo di disturbi del ritmo. Sebbene da questi dati non siano supportati da un'analisi statistica, una ragionevole interpretazione sembra suggerire l'esistenza di una relazione quantitativa diretta tra la quantità della diminuzione della corrente  $I_f$  e la gravità del fenotipo aritmico. Inoltre, i dati ottenuti mettono chiaramente in evidenza una causa diretta tra alterazione della struttura primaria del gene che codifica per il canale hHCN4, le proprietà biofisiche della corrente  $I_f$  che da questo

deriva e la condizione di alterazione del ritmo presente nel paziente portatore della mutazione.



**Figura 7** – Localizzazione delle mutazioni di hHCN4 finora individuate (I). La mutazione missenso D553N nel C-linker causa un difetto dominante nel trafficking della proteina (Ueda et Al., 2004). (II) La delezione di una base genera un codone di stop prematuro che dà origine a una proteina tronca, senza il CNBD e quindi insensibile all'AMPc (Schulze-Bahr et al., 2003) (III) La mutazione missenso S672R localizzata nel CNBD causa uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali più iperpolarizzati (Milanesi et al., 2006). (IV) La mutazione G480R localizzata nel poro porta a difetti funzionali e di espressione del canale, che sarebbero la causa della bradicardia in una famiglia (Nof et Al., 2007). (Modificata da Herrmann et al., 2007).

# INTERATTORI DEGLI HCN

I canali HCN oltre ad essere regolati dal potenziale di membrana e dai nucleotidi ciclici, possono interagire con proteine a funzione regolatrice e di supporto. Nel nostro studio ci siamo focalizzati su tre proteine, date le interessanti evidenze di interazione: MiRP1 appartenente alla famiglia dei MiRPs (*Mink related peptides*), la FLNA (filamina A) e la CAV3 (caveolina 3).

## MiRPs

I canali del potassio voltaggio dipendenti (VGK) permettono una fine regolazione dei flussi ionici che attraversano le membrane cellulari; sono un elemento chiave nel funzionamento di nervi e muscoli. Sebbene la loro unità funzionalmente attiva sia composta da un tetramero costituito da subunità  $\alpha$ , per generare la corrente nativa devono interagire con dei piccoli polipeptidi chiamati MiRPs. I MiRPs sono strutturati come singoli filamenti transmembrana codificati da geni denominati *KCNE*. Mutazioni nei geni *KCNE1*, 2 e 3 sono state associate ad aritmie farmacoindotte a disordini muscolari e nervosi come la paralisi periodica ereditaria (Abbott *et Al.*, 2001). La capacità di queste piccole proteine di interagire con molteplici tipi di subunità  $\alpha$  formanti i VGK negli esperimenti *in vitro* lascia solo intravedere l'importanza che questi piccoli polipeptidi possiedono. Nel cuore, i VGK, si attivano in corrispondenza di ogni onda depolarizzante che viaggia attraverso le cellule durante la fase eccitatoria del potenziale d'azione (Hille, 1992). L'efflusso di potassio che ne deriva ripolarizza la cellula riportandola a potenziali di riposo e chiudendo il ciclo eccitazione-contrazione. Similmente, nei neuroni facilitano la rapida trasmissione limitando le influenze eccitatorie. Le funzioni cruciali svolte dai VGK spiegano perché i farmaci che agiscono su questi canali abbiano profonde influenze sulla fisiologia umana (Sanguinetti, 1997). Come accennato prima, le sole unità tetrameriche dei VGK non sono in grado di condurre correnti con caratteristiche elettrofisiologiche identiche alle correnti native; caratteristiche invece possedute dalle correnti risultanti dalla coespressione dei tetrameri con queste subunità accessorie. I MiRPs sono quindi essenziali nella modulazione delle proprietà di questi canali (Abbott, G.W. and Goldstein, 1998). I MiRPs sono polipeptidi costituiti da 103 fino a 177 residui aminoacidici formanti un solo segmento



transmembrana putativo. Il primo gene appartenente alla famiglia, *KCNE1* fu individuato nel 1988 (Takumi and Nakanishi, 1988) e venne denominato MinK (Minimum potassium channel) poiché iniettando il corrispondente mRNA in oociti di *Xenopus* si osservò l'espressione di una corrente molto simile a quella IKs cardiaca (Takumi and Nakanishi, 1988; Sanguinetti, 1990). Inizialmente si pensò che questo piccolo polipeptide fosse in grado di formare canali funzionali autonomamente, da qui il nome che poi è rimasto. Solo più tardi, con la clonazione della subunità  $\alpha$  relativa *KCNQ1* ed in grado di formare il poro funzionale, si risolse la controversia (Wang and Curran, 1996).

La coespressione di *KCNE1* con *KCNQ1* riproduce esattamente la corrente IKs nativa cardiaca (Sanguinetti and Curran, 1996; Barhanin *et Al.*, 1996). Anche la corrente indotta da MinK negli oociti fu successivamente spiegata attribuendola alla formazione di un complesso di MinK con un ortologo di *KCNQ1* appartenente a *Xenopus laevis* (Sanguinetti and Curran, 1996). La dimostrazione definitiva dell'incapacità del solo MinK di formare canali autonomamente, avvenne con l'espressione dello stesso in cellule naturalmente prive di canali *KCNQ1*, quelle di *Chinese Hamster ovary* (CHO) (Lesage *et Al.*, 1993). MinK non solo rallenta le cinetiche di attivazione e deattivazione di *KCNQ1*, ma ne potenzia la conduttanza (Sesti and Goldstein, 1998; Yang and Sigworth, 1998). Mutazioni nella sequenza di *KCNE1* portano alla riduzione del flusso di potassio dovuto allo spostamento della curva di attivazione di *KCNQ1* verso valori più positivi (meno corrente è generata ad ogni livello di depolarizzazione) e ad una accelerata deattivazione dello stesso (Sesti and Goldstein, 1998). Il fatto che MinK sia espresso in distretti differenti quali il cuore e l'orecchio ha conseguenze patologiche diffuse, in caso di mutazione, che vanno dal prolungamento dell'intervallo QT ai difetti uditivi (Tyson *et Al.*, 1997; Swanson *et Al.*, 1993; Kaczmarek, 1997; Duggal *et Al.*, 1998). Circa dieci anni dopo vengono scoperti *KCNE2* e *KCNE3*, mentre gli altri due restanti membri della famiglia *KCNE4* e *KCNE5* sono stati individuati nei database genetici basandosi sull'omologia di sequenza, e sono stati descritti solo recentemente. *KCNE4* codifica per MiRP3 ed ha un potente effetto inibitorio su *KCNQ1* che quindi differisce moltissimo dall'effetto attivante che invece hanno *KCNE1* e *KCNE3* sulla corrente condotta da questo canale. Le caratteristiche strutturali che permettono a MiRP3 un comportamento così insolito non sono ancora state ben comprese (Manderfield *et Al.*, 2009). *KCNE5* infine, è artefice di una modulazione sia tempo che voltaggio dipendente sulle correnti condotte da *KCNQ1*. L'interazione tra *KCNQ1* e *KCNE5* studiata *in vitro* sposta la curva di attivazione *KCNQ1* a verso valori più positivi di ben 140 mV (Angelo *et Al.*, 2002). La nostra attenzione si è focalizzata su *KCNE2* che codifica la proteina umana MiRP1 (Mink-Related Peptide 1) composta da 123 aminoacidi e che è particolarmente espressa nel cuore dove è presente soprattutto nella regione del nodo del seno, e in misura minore in atri e ventricoli (Abbott, G.W and Sesti, 2000) a differenza di MiRP2 codificato dal gene *KCNE3* che è abbondante soprattutto nel muscolo scheletrico dove partecipa alla generazione della corrente condotta dal canale del potassio K.v 3.4 (Abbott, G.W and

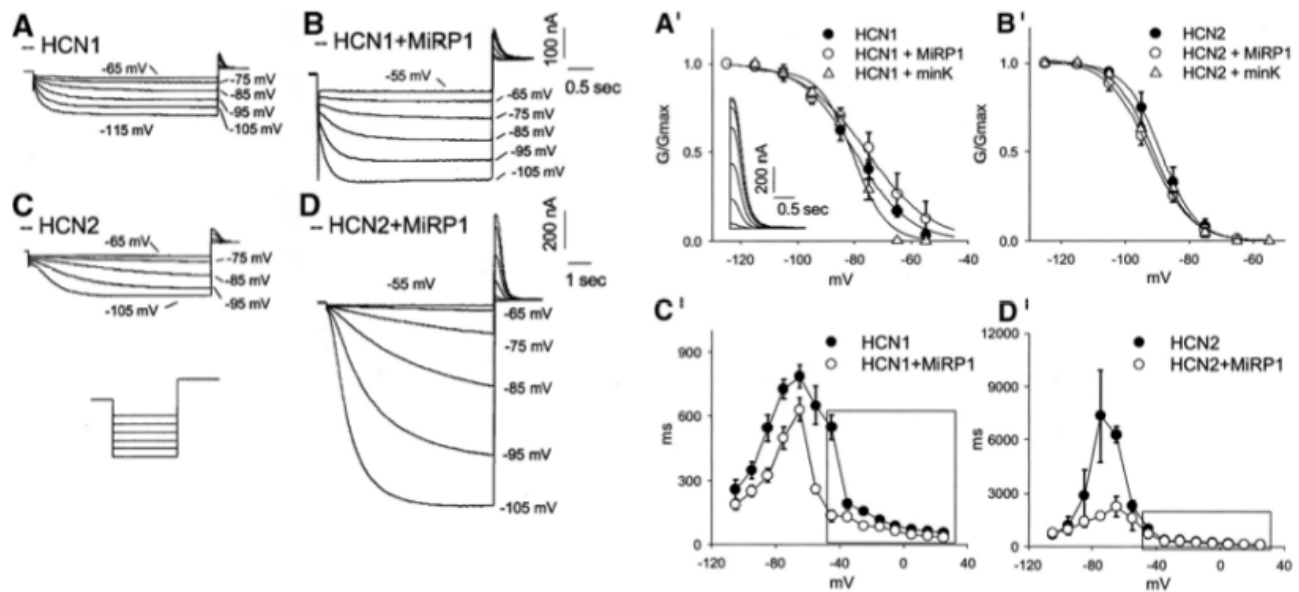
Butler, 2001) .

Analogamente a MinK, *KCNE2* forma con la sua subunità  $\alpha$ , HERG, il correlato molecolare della corrente di potassio IKr (Sanguinetti, 1995; Smith *et Al.*, 1996;). MiRP1 modula HERG in termini di conduttanza, cinetiche di attivazione, deattivazione e risposta ai farmaci. MiRP1 modulando la corrente IKr interviene nel processo di ripolarizzazione del miocardio, pertanto alterazioni della sequenza di *KCNE2* sono coinvolte nella genesi di aritmie cardiache (Abbott, G.W and Sesti, 1999). Sono state individuate quattro mutazioni correlabili al prolungamento del QT farmacoindotto e/o torsione di punta (TdP): Q9E, M54T e I57T e A116V. Tutte queste mutazioni riducono il flusso basale di potassio attraverso MiRP1\HERG. Q9E in particolare sposta la voltaggio dipendenza di HERG verso valori più positivi, M54T ne accelera la deattivazione, mentre I57T e A116V sembrano ridurre le ampiezze di corrente e il *turnover* del canale in membrana (Abbott, G.W and Sesti, 1999).

M54T, I57T e A116V furono scoperte a seguito di episodi aritmici farmacoindotti, in pazienti trattati con procainamide, oxatomide e quinidina; agenti in grado di inibire IKr ed allungare la ripolarizzazione miocardica (Abbott, G.W. Sesti, 1999). Q9E invece, venne identificata in un paziente con preesistente sindrome del QT lungo, in cui insorse una TdP che degenerò in fibrillazione ventricolare, dopo l'assunzione dell'antibiotico claritromicina ( Lee *et Al.*, 1998).

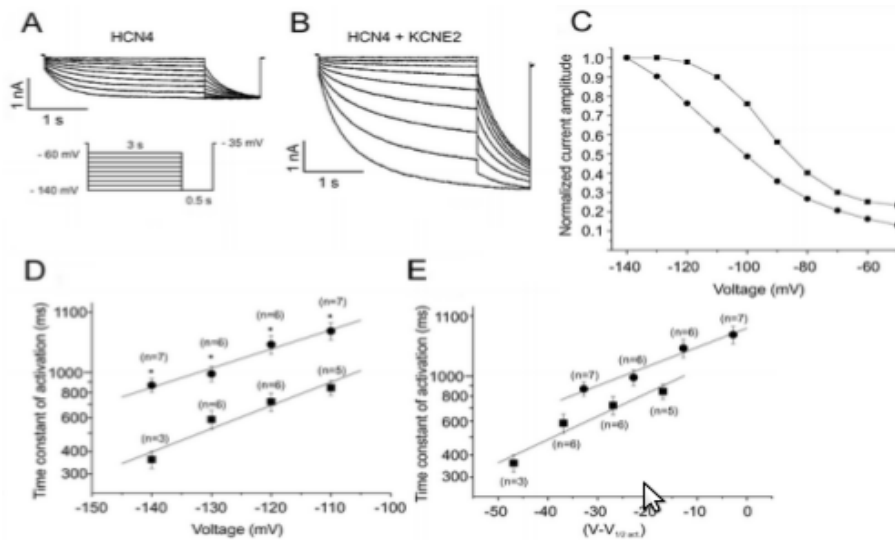
Se le quattro mutazioni descritte sopra sono molto rare (meno dello 0.02% nella popolazione generale) il polimorfismo T8A invece, è comune e presente in circa l'1.6% della popolazione generale (Abbott G.W. and Sesti, 1999). Esso non è associato a particolari modificazioni delle correnti condotte da MiRP1\HERG, ma aumenta la sensibilità a comuni antibiotici riducendone il flusso e causando anch'esso aritmia farmacoindotta (Abbott, G.W and Sesti, 1999).

Caratteristica peculiare dei MiRPs è quella di poter interagire con varie subunità  $\alpha$ . Grazie a questa caratteristica MiRP1, come dimostrato in diversi studi, può interagire anche con i canali HCN (Decher *et Al.*, 2003; Qu J. *et Al.*, 2004; Yu *et Al.*, 1995). L'espressione eterologa in oociti di *Xenopus* di HCN1 e HCN2 con MiRP1, ha dimostrato come MiRP1 influenzi le proprietà dei canali HCN: si ha infatti un aumento della corrente e della conduttanza per entrambe le isoforme HCN1 e HCN2 che tuttavia, coespressi con MiRP1, mantengono lo stesso valore di  $V_{1/2}$  (Yu *et Al.* 1995); anche se viene modificata la pendenza della curva di attivazione (Fig. 1A', B'), che diventa meno ripida (aumenta l'*inverse slope factor*); inoltre vengono velocizzate le cinetiche di attivazione mentre quelle di deattivazione rimangono pressoché invariate (Fig. 1C', D').



**Figura 1:** Coespressione di HCN1 e HCN2 con MiRP1 oociti di *Xenopus*. A-D. Correnti registrate con pulsiperpolarizzanti ai voltaggi indicati partendo da potenziali di riposo di -35 mV. A'-B'. Medie delle curve di attivazione. C'-D'. Media delle costanti di tempo di attivazione. (Da Yu et Al. 2001).

Un altro gruppo di ricerca ha dimostrato l'interazione tra HCN4 e MiRP1 in oociti di *Xenopus* e in CHO (Chinese Hamster Ovary) (Decher *et Al.*, 2003). In entrambi i tipi cellulari la coespressione delle due proteine (HCN4+MiRP1) ha portato ad un aumento della corrente passante per il canale (Fig. 2C), con un rallentamento delle cinetiche di attivazione (Fig. 2F), uno spostamento del  $V_{1/2}$  verso valori più negativi (Fig. 2E) ed un aumento dell'inversa *slope factor* della curva di attivazione.



**Figura 2:** Espressione di HCN4 e MiRP1 in CHO. A. Corrente registrata in cellule esprimenti HCN4 (il protocollo di registrazione è mostrato sotto). B. Corrente registrata in cellule esprimenti HCN4+MiRP1. C. Relazione corrente-voltage in cellule con HCN4 (■) e HCN4+MiRP1 (●). D. Grafico semilogaritmico delle costanti di attivazione di HCN4 (■) e HCN4+MiRP1 (●). E. Grafico semilogaritmico delle costanti di attivazione in funzione della differenza tra gradini di voltage e  $V_{1/2}$ . (Da Decher et Al., 2003).

Il sistema del doppio ibrido in lievito ha dimostrato come il C-terminale di MiRP1 interagisca sia con il C-terminale di HCN2 sia con quello di HCN4. Successivi studi in miociti neonatali di ratto hanno confermato i dati precedenti su HCN2 (Qu et Al., 2004), il quale è in grado di assemblarsi con MiRP1 formando un complesso funzionale; MiRP1 porta ad un aumento di corrente passante per HCN2 e accelera le cinetiche del canale, senza modificarne la voltage dipendenza.

## Filamine

Le filamine furono scoperte circa trent'anni fa. E' stata la prima famiglia di proteine leganti l'actina non muscolari, ad essere individuata (Hartwig, J. H. and Stossel, 1975). Consta di tre elementi molto conservati: la FLNA, FLNB e FLNC. Sono tutti elementi citoplasmatici ed in grado di interconnettere i filamenti di actina in una struttura tridimensionale e dinamica, la cui funzione sembra essere quella di supporto ad una grande varietà di altre proteine svolgendo quindi, versatilmente, un gran numero di ruoli (Stossel, 2001). Tutti e tre i membri sono ampiamente espressi durante tutte le fasi dello sviluppo, sebbene la FLNC abbia un'espressione più circoscritta al muscolo scheletrico e cardiaco nell'adulto (Thompson *et Al.*, 2000; Sheen *et Al.*, 2002).

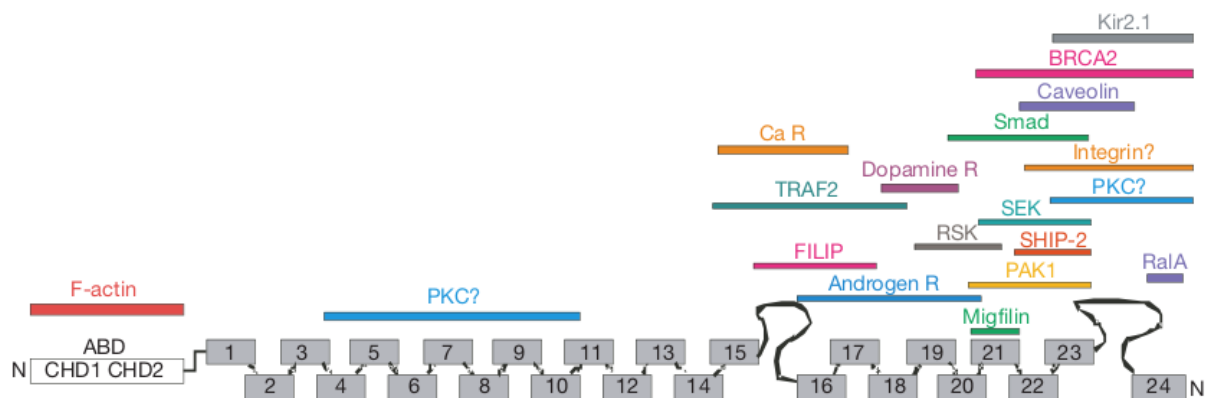
La catena polipeptidica tipica delle filamine ha un peso molecolare intorno ai 280 kD, all'N terminale presentano un *actin binding domain* (ABD) seguito da una serie di 24 ripetizioni di foglietti beta antiparalleli interrotta, in corrispondenza della ripetizione numero 15 e 23 (Fig. 3) da sequenze di circa 30 aminoacidi ciascuna, in grado di formare strutture simili a cardini flessibili denominati *hinge loops*. Proprio queste regioni sono caratterizzate da maggior variabilità di sequenza tra le tre filamine (Van der Flier, 2001). Nella regione del C terminale risiede un dominio di dimerizzazione che consente la formazione di tipiche strutture flessibili a "V" fondamentali per la funzionalità delle filamine (Gorlin *et Al.*, 1990). L'ABD è composto, come in altre proteine leganti l'actina, quali  $\alpha$ -actinina,  $\beta$ -spettrina, e distrofina da due "*calponin homology domain*" (CHD1 e CHD2) che consentono il legame con l'actina e permettono la formazione di strutture reticolate che partecipano alla locomozione cellulare, coordinando la regolazione dinamica del citoscheletro di actina (Gorlin *et Al.*, 1990; Stossel, 2001). Le strutture ripetute a foglietto beta invece, sembrano rivestire un ruolo essenziale nella formazione di interfacce di interazione proteina-proteina; ci sono evidenze di relazione con numerose proteine diverse (Fig. 3) e poiché molte proteine interagenti con le filamine sono recettori di membrana, esse giocano un ruolo fondamentale anche nella gestione di processi cellulari quali la trasduzione del segnale (Stossel, 2001).

Recenti evidenze genetiche suggeriscono che le tre filamine siano essenziali in tutte le fasi dello sviluppo umano infatti, mutazioni nelle sequenze di FLNA e FLNB sono state associate a gravi anomalie strutturali di cervello, ossa e sistema cardiovascolare. La prima patologia collegata a mutazioni nella sequenza della filamina A nell'uomo è stata l'eterotopia periventricolare nodulare bilaterale (PVNH). La PVNH è una malformazione cerebrale che risulta da un posizionamento anomalo di parte dei neuroni nella parte profonda del cervello invece che nella corteccia cerebrale. Questi neuroni formano degli agglomerati, "noduli", che possono essere individuati mediante risonanza magnetica. L'elenco delle difficoltà che affliggono questi pazienti è quindi molto lungo e con un quadro clinico in continua evoluzione. Purtroppo oggi, non si conoscono ancora soluzioni utili per aiutare questi pazienti, né prevedere l'evoluzione della stessa patologia. I risvolti pronosticabili al momento sono solo quelli che sfociano in psicopatie con manie ossessive più o meno gravi associate a disturbi neurologici quali gli

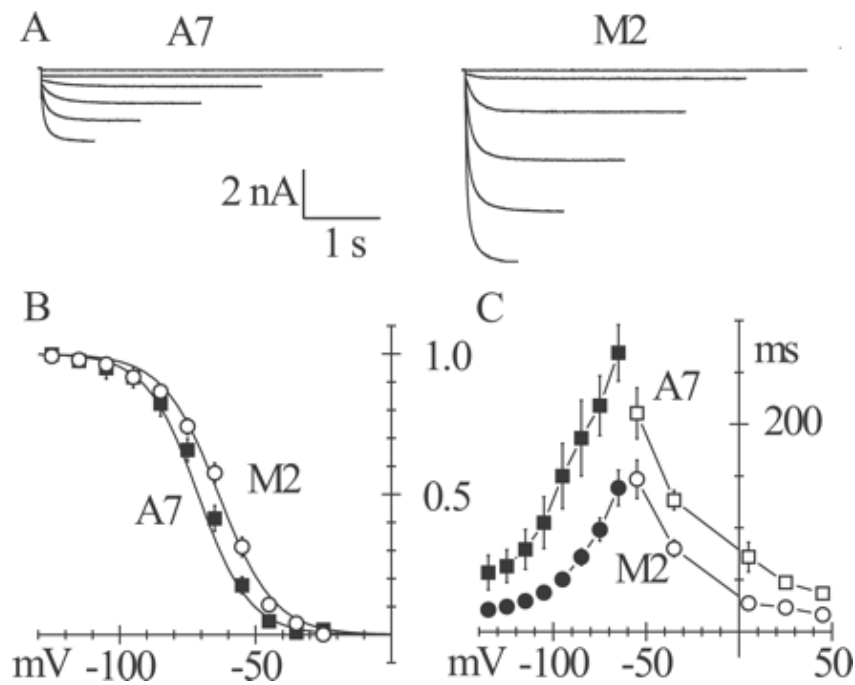
attacchi epilettici (Huttenlocher *et Al.*, 1994; Eksioglu *et Al.*, 1996). Il difetto patogenetico sembra essere a carico della migrazione dei neuroblasti durante lo sviluppo embrionale. Le mutazioni che danno origine a questa patologia sembrano tutte correlate ad uno splicing anormale dell'mRNA che da origine a proteine tronche, con perdita del C terminale, quindi di funzionalità, per l'impossibilità a dimerizzare (Moro, F. *et Al.*, 2002).

La FLNA (filamina A), su cui il nostro studio si è focalizzato, è una proteina citoscheletrica di 280 kD legante l'actina, contiene 24 ripetizioni *Ig-like* e due regioni cerniera situate tra i repeats 15 e 16 e tra i repeats 23 e 24 (Van der Flier and Sonnenberg, 2001).

Grazie a saggi di immunoprecipitazione da estratto di cervello bovino, è stato dimostrato come FLNA e HCN1 interagiscano, e questo porti alla modifica delle proprietà del canale. La regione di interazione con FLNA è situata tra i residui 694 e 715, a valle del CNBD di HCN1. La sequenza 694-715 non è conservata negli altri HCN (Gravante *et Al.*, 2004) quindi le altre isoforme non sono in grado di interagire con FLNA. La filamina A influenza la distribuzione di HCN1 in membrana: in cellule esprimenti FLNA e mHCN1, il canale si ritrova in cluster puntiformi, mentre senza la proteina citoscheletrica, HCN1 si organizza lungo tutto il perimetro della cellula (Gravante *et Al.*, 2004). Misure di patch clamp in configurazione *whole-cell* mostrano una riduzione della conduttanza in cellule di melanoma umano (A7) esprimenti FLNA e mHCN1. La curva di attivazione invece, per le cellule della linea A7 è spostata verso potenziali più negativi rispetto alle cellule della stessa linea, ma prive di FLNA (M2). Anche le costanti di tempo, di attivazione e deattivazione risultano differenti: nelle cellule esprimenti FLNA le costanti sono più grandi rispetto alle cellule che non la esprimono (Fig. 4).



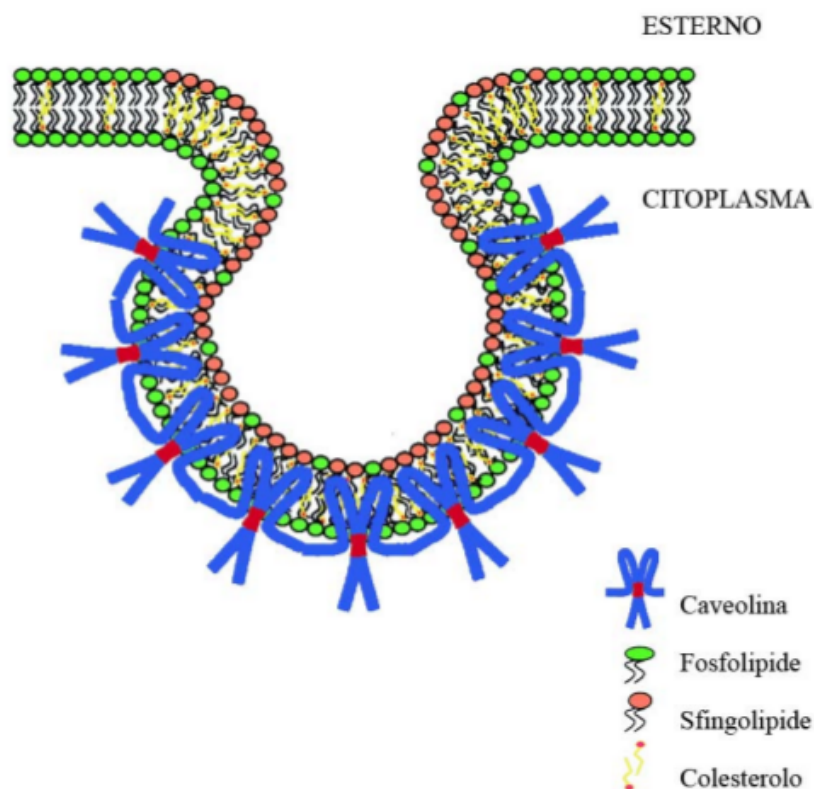
**Figura 3:** struttura della FLNA con domini di interazione con altre proteine (Da Youanyi, 2004)



**Figura 4:** A. Misure di patch clamp in configurazione whole-cell mostrano una riduzione della conduttanza nelle cellule coesprimenti FLNA e mHCN1 (A7); B. la curva di attivazione è spostata verso potenziali più negativi rispetto alle cellule della stessa linea, ma prive di FLNA le M2. C. Anche le costanti di tempo, di attivazione e deattivazione risultano differenti: nelle cellule esprimenti FLNA le costanti sono più grandi rispetto alle cellule che non la esprimono (Da Gravante et Al., 2004)

## Caveoline

Le caveolae devono la loro struttura alla presenza di aggregati di una proteina integrale di membrana, la caveolina, la cui famiglia conta tre membri, caveolina-1 (CAV1), caveolina-2 (CAV2) e caveolina-3 (CAV3) (Fig. 5).

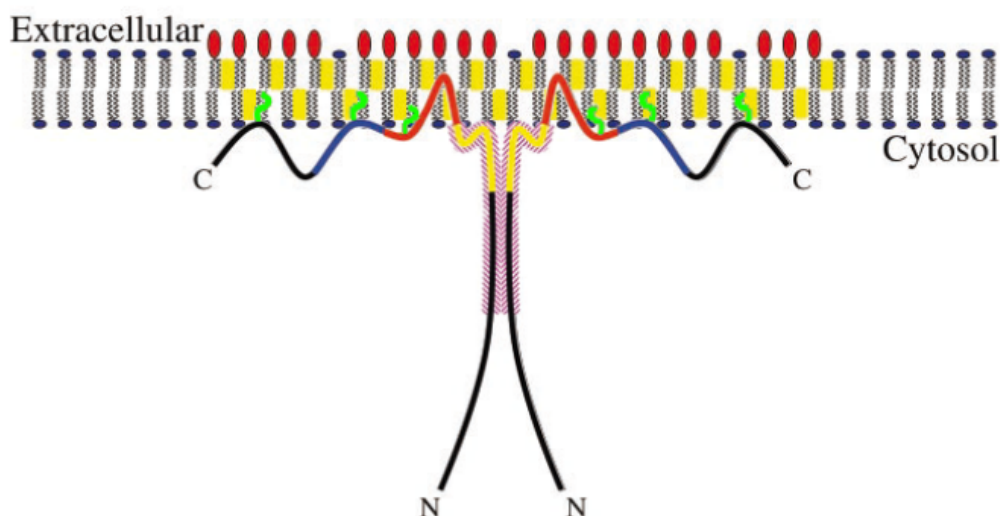


**Figura 5:** Rappresentazione schematica dell'organizzazione delle caveolæ. (Modificato da Razani *et Al.*, 2002).

La caveolina-1 è stata identificata in seguito a studi sulla tirosin chinasi del virus del sarcoma di *Rous* in fibroblasti di pollo, che hanno portato all'identificazione di un substrato di membrana della chinasi (Razani *et Al.*, 2002). Questa proteina di 22 kD è stata successivamente localizzata nel rivestimento citoplasmatico delle *caveolae* e battezzata come caveolina (Rothberg *et Al.*, 1992), in seguito è stata clonata la proteina umana sulla base del cDNA di pollo (Glenny, 1992). La caveolina-2 è stata scoperta grazie alle similitudini tra la caveolina-1 e un peptide ad essa affine isolato da caveolae di adipociti (Scherer *et Al.*, 1996). La caveolina-3 è stata trovata facendo una ricerca su database di sequenze di DNA simili alla caveolina-1, che hanno portato alla scoperta di una breve sequenza genomica nel DNA di ratto potenzialmente capace di codificare per un terzo membro della famiglia delle caveoline. La sequenza



amplificata è stata utilizzata come sonda in una library di cDNA cardiaco di ratto per rintracciare il cDNA completo (Tang *et Al.*, 1996). Le caveoline sono proteine integrate nella membrana plasmatica con le estremità N- e C- terminale citoplasmatiche (Dupree *et Al.*, 1993). Possiedono un dominio intramembrana formato da un *hairpin loop* idrofobico (Monier *et Al.*, 1996), un dominio N-terminale detto N-MAD (N-Membrane Attachment Domain) corrispondente allo scaffolding domain, un dominio C-terminale detto C-MAD e un dominio di oligomerizzazione. In CAV1: N-MAD comprende i residui da 82 a 101, C-MAD i residui da 135 a 150; tali domini sono necessari per l'ancoraggio alla membrana, al contrario del dominio intramembrana che non risulta necessario a questa funzione (Schlegel *et Al.*, 2000).

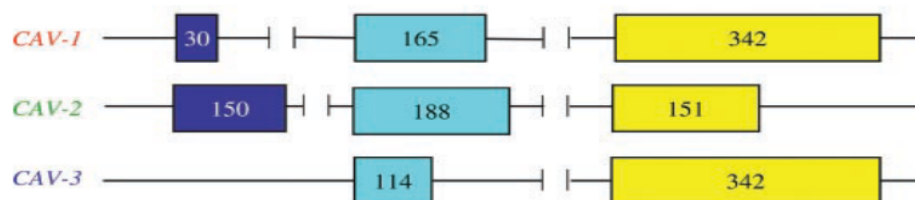


**Figura 6:** Struttura schematica di CAV1: in giallo è evidenziato l'N-MAD/scaffolding domain, in rosso il dominio transmembrana, in blu il C-MAD, in rosa il dominio di oligomerizzazione, in verde i gruppi palmitoilici. Modificato da (Cohen *et Al.*, 2004).

Il dominio di oligomerizzazione è rappresentato in CAV1 dai residui 61-101 (Sargiacomo *et Al.*, 1995). Grazie a questo dominio, CAV1 è in grado di formare omo-oligomeri di circa 14-16 monomeri (Sargiacomo *et Al.*, 1995) ed etero-oligomeri con CAV2 (Scherer *et Al.*, 1997), altrimenti incapace di formare aggregati. Anche CAV3 è in grado di omo-oligomerizzare (Tang *et Al.*, 1996). Gli oligomeri di CAV1 si associano tra loro a formare la rete di caveoline che si ritrova in membrana attraverso interazioni C-terminale / C-terminale e C-terminale / N-terminale (Song, 1997). Gli oligomeri iniziano a formarsi rapidamente dopo la sintesi proteica (Monier *et Al.*, 1996) e continuano durante il trasporto dall'apparato di Golgi verso la membrana citoplasmatica. Lo scaffolding domain della caveolina-1 (CSD) è in grado di interagire con il Caveolin Binding Motif (CBM) che è una sequenza caratteristica presente in numerose

proteine (G-protein, Ha-Ras, chinasi della famiglia Src) (Li and Lisanti. 1996): la sua sequenza è stata utilizzata per cercare ulteriori proteine capaci di interagire con esso. Il CBM interagisce con le caveoline-1 e -3, ed è costituito da aminoacidi non specifici intercalati tra aminoacidi aromatici (rappresentati dal simbolo  $\Phi$ ) secondo le sequenze  $\Phi\text{XXXX}\Phi\text{XX}\Phi$  e  $\Phi\text{X}\Phi\text{XXXX}\Phi$  (Couet *et Al.*, 1997).

Il CSD svolge quindi una duplice funzione: da un lato ancora varie proteine all'interno delle caveolae, dall'altro regola l'attività delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Ad esempio, è stato dimostrato come un peptide contenente il CSD di CAV1 interagisca con la subunità  $\alpha$  delle G-protein preferenzialmente nella sua forma inattiva, impedendo lo scambio GDP/GTP e inibendo l'attività della GPCR (Li *et Al.*, 1995). La caveolina-1 e la caveolina-3 possiedono dei residui conservati di cisteina (133, 143, 156 per CAV1; 106, 116 e 129 per CAV3) che possono essere palmitoilati. Questi residui non sono necessari per la localizzazione nelle caveolae delle proteine (Dietzen *et Al.*, 1995) ma la loro palmitoilazione stabilizza gli oligomeri (Monier *et Al.*, 1996), controlla la capacità delle caveoline di legare proteine (come la chinasi Src (Lee *et Al.*, 2001) e regola il trasporto del colesterolo in membrana (Uittenbogard and Smart. 2000). La caveolina-2 invece non possiede cisteine conservate. CAV1 possiede anche delle tirosine che possono essere fosforilate: Y14 è bersaglio della chinasi Src (Li *et Al.*, 1996) e risulta essere coinvolta nel pathway di risposta agli stimoli di crescita, diventando un sito di legame per Grb7 (Lee *et Al.*, 2000). Inoltre tutte le caveoline posseggono la sequenza amminoacidica 'FEDVIAEP', la quale è considerata un marcatore della famiglia delle caveoline. Il gene della caveolina-1 è situato sul cromosoma 7 (q31.1) ed è formato da 3 esoni, il gene della caveolina-2 è situato sul cromosoma 7 (q31.1) ed è formato da 2 esoni, il gene della caveolina-3 è situato sul cromosoma 3 (p25) ed è formato da 2 esoni.



**Figura 7:** Rappresentazione schematica dei geni appartenenti alla famiglia delle caveoline con riferimento agli esoni e alla loro lunghezza. (Da Cohen *et Al.* 2004).

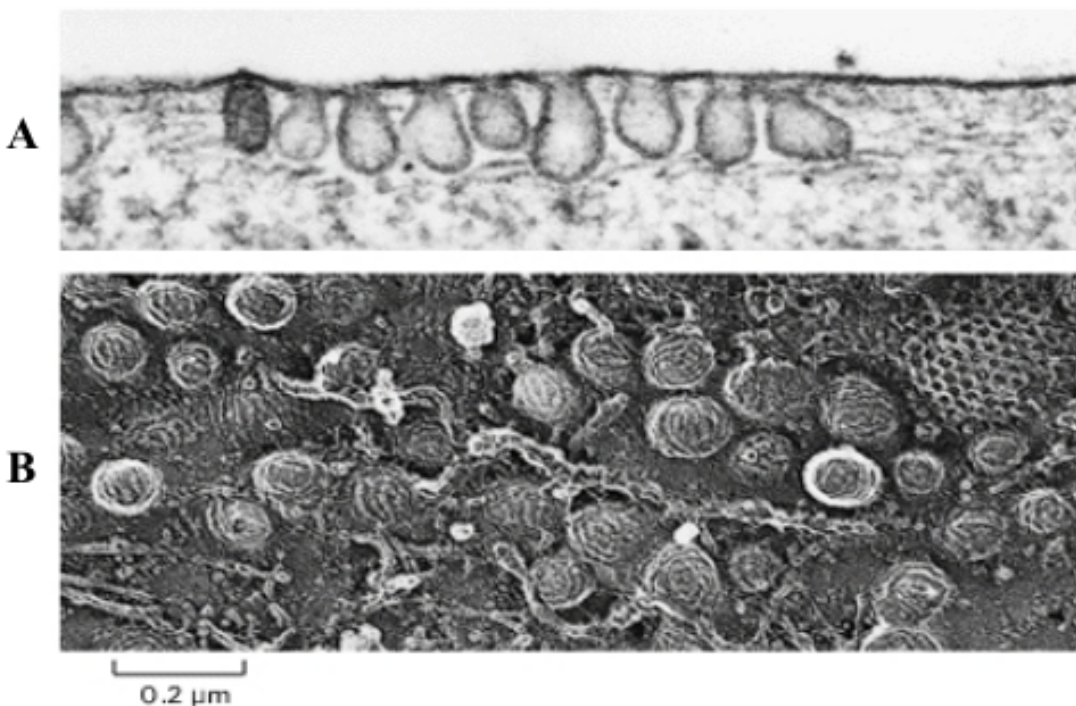
CAV1 ha due isoforme: la CAV1- $\alpha$  è composta dagli aminoacidi risultanti dall'intera sequenza codificante (178 aminoacidi), mentre la CAV1- $\beta$  è composta da 147 aminoacidi e contiene gli stessi residui di CAV1- $\alpha$  tranne i primi 31 (Scherer *et Al.*, 1995). Sono entrambe in grado di portare alla

formazione delle caveolae in cellule che ne sono prive (Li *et Al.*, 1996) tuttavia l'isoforma  $\alpha$  è più efficiente nella formazione di caveolae rispetto all'isoforma  $\beta$ , inoltre si trova preferenzialmente nelle invaginazioni profonde con un rapporto  $\alpha/\beta$  maggiore rispetto a quelle superficiali (Fujimoto *et Al.*, 2000). La caveolina-1, principale isoforma presente nelle caveolae (Rothberg *et Al.*, 1992), si ritrova nei vari tipi cellulari che presentano queste strutture come gli adipociti, le cellule endoteliali, i fibroblasti, le cellule muscolari lisce e gli pneumociti di tipo I. CAV2 ha tre isoforme: la CAV2- $\alpha$  è composta dagli amminoacidi risultanti dall'intera sequenza codificante (162 aminoacidi) e mostra una similitudine con CAV1 del 58% e un'identità del 38%. Le restanti CAV2- $\beta$  e CAV2- $\gamma$  sono sequenze parziali della isoforma  $\alpha$  (Fra *et Al.*, 2000); (Li *et Al.*, 1998), di esse è poco nota la funzione. CAV2 non risulta necessaria alla formazione delle caveolae (Razani *et Al.*, 2002.) anche se è stato dimostrato come la sua coespressione con CAV1 porti alla formazione di invaginazioni della membrana *le caveolae* più profonde (Fujimoto *et Al.*, 2000) ed abbondanti rispetto a quelle formate dalla sola caveolina-1 (Lahtinen *et Al.*, 2003); inoltre, in assenza di CAV1, CAV2 rimane localizzata nel Golgi e va incontro a degradazione nel proteosoma (Razani *et Al.*, 2001). CAV2 segue quindi l'espressione di CAV1 (Scherer *et Al.*, 1997), infatti in modelli di topo KO per CAV1 sinota l'assenza di espressione di CAV2 (Razani *et Al.*, 2001). CAV3 è una proteina di 151 amminoacidi molto simile per struttura e proprietà a CAV1, ha infatti una percentuale di similarità dell'85% e di identità del 65%. È stato dimostrato come anche CAV3 sia in grado di portare alla formazione di caveolae in cellule che non presentano queste invaginazioni (Li *et Al.*, 1998), sottolineando ulteriormente la similitudine tra caveolina-1 e caveolina-3. CAV3 interagisce con varie proteine localizzate nella membrana plasmatica, come eNOS (*endotelial Nitric Oxide Syntase*) (Feron *et Al.*, 1996), il recettore  $\beta$ -adrenergico e l'adenilato ciclasi (Rybin *et Al.*, 2000), evidenziando il suo ruolo sia dal punto di vista di regolazione della trasduzione del segnale, sia a livello strutturale in quanto può interagire con la distrofina e con i complessi di distroglicano (Song *et Al.*, 1996; Sotgia *et Al.*, 2000). L'interazione tra CAV3 ed eNOS è di particolare interesse per quanto riguarda il controllo autonomico del battito cardiaco. È stato infatti dimostrato come, in un sistema cellulare di miociti neonatali di topo KO per eNOS, la coespressione di eNOS wild type e CAV3 porti all'annullamento dell'effetto cronotropo negativo del carbacolo (un agonista muscarinico). Infatti, miociti esprimenti la eNOS wild type ma non CAV3 rispondono al carbacolo con un aumento del GMPc e una diminuzione della frequenza di battito, mentre la coespressione di eNOS wild type con CAV3 riduce l'aumento del nucleotide ciclico (Feron *et Al.*, 1996). La localizzazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici nelle caveolae dei cardiomiociti (Steinberg *et Al.*, 2004) risulta estremamente importante in quanto, come precedentemente esposto, si ha interazione con i canali HCN4 e di conseguenza CAV3 esercita un ruolo di modulazione dell'attività del canale pacemaker nativo. La caveolina 3 è stata recentemente identificata anche a livello dei neuroni ippocampali dove partecipa al *signaling* estradiolo mediato (Boulware *et Al.*, 2007) divenendo

inaspettatamente importante non solo per le cellule muscolari ma anche per quelle neurali neurali.

## Le caveolae

La membrana plasmatica delle cellule presenta delle particolari regioni dette *lipid rafts*, letteralmente definiti "zattere lipidiche". I *lipid rafts* sono domini prevalentemente costituiti da glicosfingolipidi e sfingolipidi con alte concentrazioni di colesterolo; gli acidi grassi degli sfingolipidi sono saturi e hanno catene più lunghe, permettendo un maggiore impaccamento delle molecole e un conseguente aumento della temperatura di melting (Schroeder *et Al.*, 1994). Esiste un particolare tipo di lipid raft detti *caveolae*.



**Figura 8:** A. Sezione trasversale di fibroblasto al microscopio elettronico, si possono notare le caveolae. B. Foto al microscopio elettronico deep-etching di caveolae viste dal lato citoplasmatico. (Da Alberts *et Al.*, 2008).

Le *caveolae* ricche di caveoline, si presentano come invaginazioni della membrana cellulare dalla caratteristica forma ad 'omega' (50-100 nm), possono trovarsi singolarmente (Fig. 8) od organizzate in una struttura simile ad un grappolo. Sono abbondantemente diffuse in molti tipi cellulari quali gli adipociti (Fan *et Al.*, 1983), le cellule endoteliali, gli pneumociti di tipo I (Simionescu, 1983), le cellule muscolari lisce (Forbes *et Al.*, 1979) e i fibroblasti (Bretscher, 1977). Le caveolae sono coinvolte in fenomeni cellulari quali la transitosi (Ghitescu *et Al.*, 1986; Simionescu, 1975) e l'endocitosi (Orlandi,

1998), inoltre fungono da ancoraggio, formando dei compartimenti, per numerose proteine che svolgono vari ruoli citoplasmatici, come la Src e altre proteine coinvolte nei pathway di trasduzione del segnale (Lisanti *et Al.*, 1994).

## Caveolinopatie

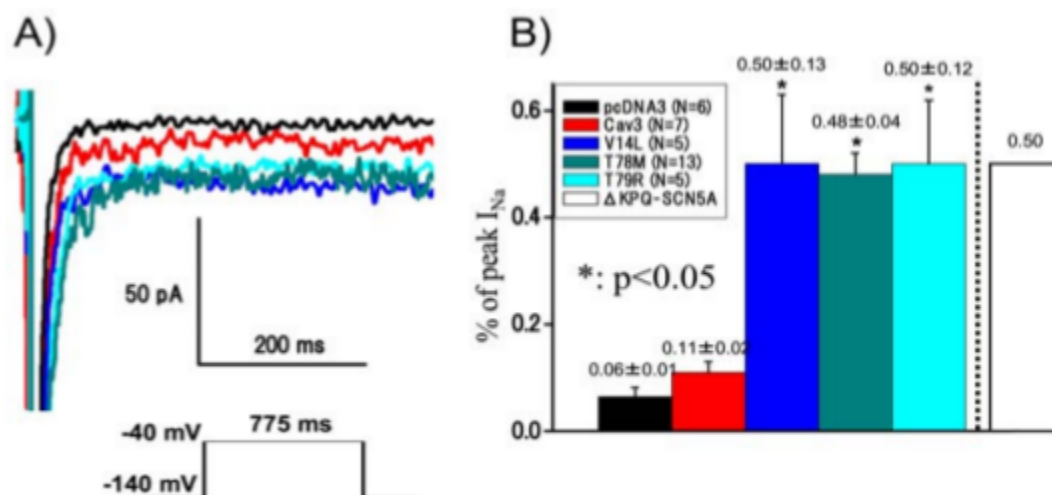
Le *caveolae* sono ampiamente distribuite in molti tessuti dell'organismo e svolgono svariate funzioni. Sono stati quindi svolti studi alla ricerca di un possibile coinvolgimento delle caveoline nelle patologie. È stato indagato il ruolo di CAV1 nello sviluppo tumorale, in quanto numerosi studi indicano questo gene come oncosoppressore. Ad esempio, in uno studio sul tumore al seno è stata identificata la mutazione P132L nel 16% dei casi; successive analisi su linee cellulari esprimenti tale mutazione hanno mostrato attivazione costitutiva di MAPK e p38-MAPK, mentre la capacità invasiva è paragonabile alle cellule trasformate con v-Src (Hayashi *et Al.*, 2001). Studi successivi hanno dimostrato come il mutante P132L risulti trattenuto nel Golgi ed agisca in maniera dominante negativa (Lee *et Al.*, 2002). CAV3 risulta coinvolta in un eterogeneo panorama di patologie muscolari definite caveolinopatie. CAV3 è stata candidata come proteina coinvolta nelle distrofie muscolari poiché è nota interagire con il  $\beta$ -destroglicano e la distrofina. Poiché sia CAV3 sia la distrofina posseggono un dominio WW-like (dato dalla sequenza W-(X)18- $\Phi$ -X- $\Phi$ -(X)8-W-(X)3-P, dove X rappresenta un generico amminoacido, W il triptofano, P la prolina e  $\Phi$  un amminoacido aromatico), è stato ipotizzato che la caveolina-3 possa inibire il legame della distrofina e alterare il reclutamento della proteina verso il sarcolemma. In pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è stato dimostrato un aumento di espressione di CAV3 e un aumento del numero e delle dimensioni delle caveolae (Bonilla *et Al.* 1981; Repetto *et Al.*, 1999). Sono state identificate tre anomalie geniche in CAV3 correlate alla distrofia muscolare dei cingoli 1C (LGMD-1C, Limb Girdle Muscle Dystrophy 1C): la prima è una mutazione con cambio amminoacidico in posizione 104 (P104L), la seconda è una delezione di 9 bp a livello dello scaffolding domain dove vengono rimossi i residui 63- 65 ( $\Delta$ TFT) con conseguente drastica riduzione dell'espressione di CAV3 e della formazione di caveolae sarcoplasmatiche (Minetti *et Al.*, 1998).

Due mutazioni in eterozigosi sono state identificate in soggetti affetti da iperCKemia (alti livelli sierici di creatin chinasi): la prima, R26Q, è stata riscontrata in due bambini senza alcun legame di parentela o familiarità per patologie muscolari (Carbone *et Al.*, 2000), la seconda (P28L) è stata riscontrata in un ragazzo e nella madre (Merlini *et Al.*, 2002). In tutti e quattro i casi è stata riscontrata una riduzione del livello di espressione di CAV3 (seppur inferiore a quello dei pazienti LGMD-1C). È infine interessante notare come R26Q appaia come mutazione de novo nei due bambini, essendo assente nei genitori. Studi

di linkage hanno portato ad indagare CAV3 come putativo gene implicato nella Ripple Muscle Disease (RDM): lo screening del gene ha evidenziato tre mutazioni con cambio amminoacidico (A45T, R26Q e P104L) in una famiglia, mentre in altre due famiglie è stata riscontrata la mutazione A45V (Betz *et Al.*, 2001). Studi di espressione condotti su tre delle mutazioni scoperte nelle patologie muscolari (nello specifico, R26Q,  $\Delta$ TFT e P104L) hanno mostrato come  $\Delta$ TFT e P104L agiscano in maniera dominante negativa, mentre R26Q non riduce i livelli di proteina CAV3 wild type (Sotgia *et Al.*, 2000). È stata inoltre riscontrata una mutazione in CAV3 in due fratelli affetti da cardiomiopatia ipertrofica, la T63S. Anche questa mutazione porta ad una diminuzione dei livelli di espressione della proteina, tuttavia in maniera ridotta rispetto a quanto avviene per la  $\Delta$ TFT, che interessa la stessa posizione (Hayashi *et Al.*, 2004).

## Caveolina-3 e aritmie

L'esistenza di un tipo di sindrome del QT lungo (LQTS) dovuta a mutazioni in una proteina capace di interagire con canali ionici (anchirina B) ha dato spunto ad ulteriori indagini sulle proteine associate ai canali per identificare nuovi responsabili molecolari della patologia. Vatta e il suo gruppo (Vatta *et Al.*, 2006) hanno effettuato analisi genetiche su CAV3 in pazienti affetti da LQTS ed hanno identificato quattro nuovi polimorfismi: T78M, A85T, F97C e S141R. T78M è stata trovata in tre pazienti con familiarità per la patologia, due imparentati tra loro ed entrambi con bradicardia sinusale (uno di essi presenta anche una mutazione nota per causare un LQTS di tipo 2). A85T è stata trovata in una paziente priva di familiarità per la patologia. F97C è stata trovata in una bambina con tratto QT allungato solo in seguito all'assunzione di  $\beta$ -agonisti per l'asma, senza familiarità. S141R è stata trovata in un paziente senza familiarità per la patologia. Analisi elettrofisiologiche in cellule HEK 293 esprimenti sia il canale hNav1.5 wild type sia le varianti mutate della proteina CAV3 (F97C e S141R) hanno mostrato un aumento della corrente tardiva di sodio (INa), rispetto a misurazioni condotte con CAV3 wild type. L'aumento di INa è paragonabile a quello dovuto a mutazioni del canale di sodio presenti nei pazienti con LQTS di tipo 3. Studi di immunoprecipitazione hanno mostrato che le mutazioni F97C e S141R non portano alla perdita dell'associazione del canale con CAV3, sebbene non siano valutabili modifiche a livello qualitativo dell'interazione stessa. Successivamente, Cronk e colleghi (Cronk *et Al.*, 2007) hanno svolto analisi genetiche su una coorte di neonati deceduti per sindrome da morte improvvisa (SIDS, Sudden Unexpected Death Syndrome). Sono stati trovati tre diversi polimorfismi in tre infanti afroamericani: V14L, T78M e L79R.



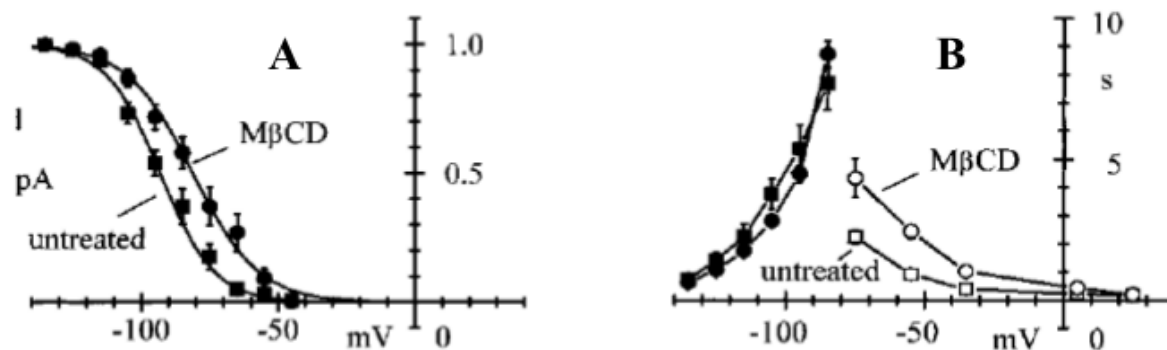
Figura

**Figura 9:** Tracce di corrente  $I_{Na}$  nel WT e nei mutanti V14L, T78M, T79R e  $\Delta KPQ$ -SCN5A (associata con LQTS di tipo 3), registrate usando il protocollo indicato. B. Istogrammi rappresentanti la percentuale di picchi di  $I_{Na}$  nei mutanti rispetto al WT. (Da Cronk et Al., 2007).

Studi di elettrofisiologia delle tre mutazioni sono stati effettuati in cellule HEK 293 esprimenti il canale del sodio cardiaco hNav1.5 ed è stato dimostrato come tutte le mutazioni portino ad un notevole aumento della corrente  $I_{Na}$  (Fig. 9). Per quanto riguarda le mutazioni responsabili delle caveolinopatie sono in corso indagini volte a determinare il loro effetto sul cuore e sul ritmo.

## Caveolina 3 e canali HCN

È stato dimostrata la localizzazione del canale HCN4 all'interno dei lipid rafts in cellule HEK 293 e in miociti isolati da NSA di coniglio (Barbuti et Al., 2004). Questa localizzazione influenza il comportamento del canale HCN4 e del canale If nativo: infatti l'utilizzo di un agente disaggregante il colesterolo come la metil- $\beta$ -ciclodestrina (M $\beta$ CD) comporta uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali più positivi (Fig. 10A) e un rallentamento delle cinetiche di deattivazione (Fig. 10B).



**Figura 10:** A. Curve di attivazione del canale HCN4 espresso in cellule HEK 293, senza (■) e con trattamento con ciclodestrina (●). B. Curve delle costanti di tempo di attivazione (simboli pieni) e deattivazione (simboli vuoti), in cellule di controllo (■ e □) e cellule trattate con ciclo destrina (● e ○). (Da Barbuti et Al., 2004)

Successivi studi hanno dimostrato come il canale HCN4 e la proteina caveolina-3 interagiscano in miociti isolati da NSA di coniglio, localizzando il canale nelle caveolae (Barbuti et Al., 2007). È inoltre stato dimostrato come nelle caveolae dei miociti senoatriali sia localizzato il recettore  $\beta 2$ -adrenergico, il quale influenza maggiormente la risposta autonoma del canale rispetto all'isoforma  $\beta 1$  che risulta esclusa dalle caveolae: l'utilizzo della M $\beta$ CD annulla la maggior risposta del canale all'utilizzo di agonisti del recettore  $\beta 2$  rispetto a quelli dell'isoforma  $\beta 1$ .



## SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro è stato condotto uno screening genetico di alcune categorie di pazienti, volto ad identificare polimorfismi e/o mutazioni nei geni *hCAV3*, *hMiRP1* e *hFLNA*, interattori molecolari dei canali HCN, che potessero essere coinvolte direttamente o indirettamente nello sviluppo del fenotipo patologico. I soggetti dello studio sono stati individui affetti dalle seguenti patologie: bradicardia sinusale, tachicardia sinusale, fibrillazione atriale parossistica ed epilessia. Inoltre sono stati analizzati individui deceduti improvvisamente senza causa nota e feti deceduti durante la gestazione.

# MATERIALI E METODI

Lo screening è stato condotto in collaborazione con diversi gruppi di ricerca ed enti ospedalieri che hanno fornito i pool di pazienti oggetto del presente studio. Tranne che per il gene *hFLNA* che è stato analizzato solo per i pazienti epilettici, l'analisi dei geni *hCAV3* e *hMiRPI* è stata effettuata su categorie di soggetti di età variabile, così suddivise:

|                                                                          |                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>Pazienti affetti da alterazioni del ritmo cardiaco (N° tot = 164)</b> |                                                             |
| 107                                                                      | Bradicardia sinusale ( <b>BRA</b> )                         |
| 38                                                                       | Tachicardia sinusale ( <b>TSI</b> )                         |
| 19                                                                       | Fibrillazione atriale parossistica ( <b>FAP</b> )           |
| <b>Soggetti deceduti improvvisamente senza causa nota (N° tot = 62)</b>  |                                                             |
| 21                                                                       | Sudden Unexpected Death Syndrome ( <b>SUDS</b> )            |
| 4                                                                        | Sudden Infant Death Syndrome ( <b>SIDS</b> )                |
| 37                                                                       | Sudden Antenatal Death Syndrome ( <b>SADS</b> o Stillbirth) |
| <b>Soggetti affetti da epilessia idiopatica (N°110)</b>                  | Epilessia idiopatica ( <b>EPI</b> )                         |

**Tabella 1:** *Tipologie di pazienti sottoposte a screening.*

Prima di procedere allo screening genetico sono state raccolte le autorizzazioni al trattamento del materiale genetico secondo norma di legge. Il materiale genetico è stato ottenuto a partire da campioni biologici (sangue intero, cellule della mucosa buccale, etc.).

## Estrazione del materiale genetico

L'estrazione del DNA dai campioni biologici è stata effettuata utilizzando il kit commerciale *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN™).

### Protocollo standard di estrazione del dna da campioni ematici

- Pre-riscaldare un bagnetto a 56°C
- Prelevare 200 µL di sangue ed inserirli in una provetta sterile da 1,5 mL
- Aggiungere al campione 20 µL di QIAGEN Protease (o Proteinasi K)
- Aggiungere 200 µL di Buffer AL e agitare per 5" tramite vortex per ottenere una soluzione omogenea
- Incubare la soluzione per 10 minuti a 56°C
- Aggiungere 200 µL di etanolo (96-100%) e agitare tramite vortex per 15"
- Trasferire la soluzione in una QIAmp Mini Spin Column
- Centrifugare a 6000 g (8000 rpm) per 1 minuto a temperatura ambiente
- Scartare il tubo di raccolta e trasferire la colonna in un tubo pulito
- Aggiungere in colonna 500 µL di buffer AW1
- Centrifugare a 6000 g (8000 rpm) per 1 minuto a temperatura ambiente
- Scartare il tubo di raccolta e trasferire la colonna in un tubo pulito
- Aggiungere in colonna 500 µL di buffer AW2
- Centrifugare a 20000 g (14000 rpm) per 3 minuti a temperatura ambiente
- Sostituire il tubo di raccolta con uno pulito e centrifugare nuovamente a 20000 g (14000 rpm) per 1 minuto
- Rimuovere il tubo di raccolta e sistemare la colonna in una provetta sterile da 1,5 mL
- Aggiungere in colonna 200 µL di buffer AE
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto
- Centrifugare a 6000 g (8000 rpm) per 1 minuto a temperatura ambiente
- Eliminare la colonna e conservare il campione a +4°C o a -20°C

### **Protocollo standard di estrazione del dna da tampone buccale**

- Pre-riscaldare un bagnetto a 56°C
- Trasferire la parte cotonata del tampone buccale in una provetta da 2 mL ed aggiungere 400 µL di PBS (*Phosphate Buffer Saline*)
- Aggiungere al campione 20 µL QIAGEN Protease (o Proteinasi K)
- Aggiungere 400 µL di Buffer AL e agitare per 5'' tramite vortex per ottenere una soluzione omogenea
- Incubare la soluzione per 10 minuti a 56°C
- Aggiungere 400 µL di etanolo (96-100%) e agitare tramite vortex per 15''
- Trasferire la soluzione in una QIAamp Mini Spin Column
- Centrifugare a 6000 g (8000 rpm) per 1 minuto a temperatura ambiente
- Scartare il tubo di raccolta e trasferire la colonna in un tubo pulito
- Aggiungere in colonna 500 µL di buffer AW
- Centrifugare a 6000 g (8000 rpm) per 1 minuto a temperatura ambiente
- Scartare il tubo di raccolta e trasferire la colonna in un tubo pulito
- Aggiungere in colonna 500 µL di buffer AW2
- Centrifugare a 20000 g (14000 rpm) per 3 minuti a temperatura ambiente
- Sostituire il tubo di raccolta con uno pulito e centrifugare nuovamente a 20000 g (14000 rpm) per 1 minuto
- Rimuovere il tubo di raccolta e sistemare la colonna in una provetta sterile da 1,5 mL
- Aggiungere in colonna 200 µL di buffer A
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto
- Centrifugare a 6000 g (8000 rpm) per 1 minuto a temperatura ambiente
- Eliminare la colonna e conservare il campione a +4°C o a -20°C

## **Quantificazione del DNA**

La quantificazione del DNA è stata effettuata utilizzando lo spettrofotometro *Ultrospec 1100 Pro* (Amersham Biosciences™). L'analisi spettrofotometrica si basa sulla determinazione dell'assorbanza di una soluzione di DNA ad una lunghezza d'onda di 260 nm. È necessario determinare anche la lettura della soluzione a 280 nm, valore corrispondente al picco di massimo assorbimento delle proteine. Il

rapporto tra assorbanza a 260 nm e assorbanza a 280 nm rappresenta una buona stima della purezza del DNA: un valore uguale o maggiore di 1,8 indica una soluzione pura, al contrario un valore minore a 1,8 indica una contaminazione della soluzione da parte di proteine. In alternativa una stima approssimativa della quantità di DNA può essere effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% confrontando la banda del DNA genomico con quelle del ladder da 1 kb (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder della Fermentas<sup>TM</sup>*).

## Polymerase Chain Reaction (PCR)

La reazione a catena della polimerasi (o *Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica di biologia molecolare in grado di amplificare specifiche sequenze di DNA in maniera esponenziale ( $2^n$ , dove  $n$  è il numero di cicli) grazie all'azione catalitica dell'enzima TAQ polimerasi (una DNA polimerasi stabile alle alte temperature). La selezione della sequenza da amplificare viene fatta attraverso la scelta di una coppia di primer (oligonucleotidi complementari agli estremi della regione di interesse), forward (5'-3') e reverse (3'-5'), i quali deve avere determinate caratteristiche:

- lunghezza compresa tra le 15 e le 25 bp
- contenuto in GC compreso tra 40-60%
- temperatura di melting ( $T_m$ ) simile e compresa tra i 50°-70°C
- elevata specificità per la sequenza di interesse

incapacità a formare strutture secondarie e dimerizzare

La temperatura di annealing è la temperatura alla quale il primer si appaia al singolo filamento di DNA e solitamente viene calcolata come  $T_m$  media dei primer meno 5°C. Più una coppia di primer ha una  $T_m$  simile, più efficiente sarà la reazione in quanto la fase di annealing si svolgerà ad una temperatura che favorisce l'appaiamento di entrambi i primer.

### Protocolli di reazione

Per l'analisi del gene sono stati disegnati specifici programmi di amplificazione.

Il geni sono stati suddiviso in un opportuno numero di ampliconi comprendenti le regioni esoniche e parte delle regioni introniche (siti di splicing). La lunghezza dei singoli ampliconi (compresa tra 195-251 bp) è stata scelta in base alle caratteristiche condizioni richieste dai successivi passaggi analitici (SSCP,

DHPLC).

Il programma di PCR si compone di diverse fasi:

1. Pre-denaturazione a 95°C per 5'
2. Denaturazione a 95°C
3. Annealing, fase a  $T_m$  dei primer o intermedia tra esse, permette l'appaiamento dei primer con lo stampo di DNA
4. Allungamento a 72°C, è la temperatura ottimale di sintesi per la TAQ polimerasi
5. 72°C per 10'' per permettere alla polimerasi di terminare la sintesi del neo-filamento di DNA

In base al tipo di amplicone e alle osservazioni sperimentali, per le fasi 2, 3 e 4 è stato scelto un numero di cicli compreso tra 30 e 35, con una durata di 30 secondi per ogni fase.

La reazione di polimerizzazione avviene in una miscela di reazione in cui, oltre al DNA e all'enzima Taq polimerasi, sono presenti desossiribonucleotidi (A, T, G, C), un tampone di reazione specifico e ioni  $Mg^{++}$  indispensabili sia per la reazione di polimerizzazione sia per la stabilità dell'acido nucleico.

Per le nostre reazioni di PCR è stata utilizzata la *FastStart Taq DNA Polymerase* (ROCHE™) in una mix di reazione così composta:

|                         | <b>Concentrazione iniziale</b> | <b>Concentrazione finale</b> |
|-------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>DNA</b>              | 100 ng/μl                      | 5 ng/μl                      |
| <b>PCR Buffer</b>       | 10X                            | 1X (2mM MgCl <sub>2</sub> )  |
| <b>GC-RICH solution</b> | 5X                             | 1X                           |
| <b>dNTPs</b>            | 100 mM (per ogni dNTP)         | 0,2 mM (per ogni dNTP)       |
| <b>Oligo forward</b>    | 25 μM                          | 1,25 μM                      |
| <b>Oligo revers</b>     | 25 μM                          | 1,25 μM                      |
| <b>Taq Polimerasi</b>   | 5U/μl                          | 0.05 U/μl                    |
| <b>H2O     Milli-Q®</b> | Al volume finale di 20 μl      |                              |

**Tabella 2:** *Mix di reazione PCR*

### **Primer**

Il gene **hCAV3** (Ensembl:ENSG00000182533) è stato analizzato per entrambi i suoi esoni, il secondo dei quali (di lunghezza 344 bp) è stato suddiviso in tre ampliconi. Per ciascun amplicone sono state messe a punto le condizioni ottimali di amplificazione qui di seguito riportate:

| <b><i>Amplicone</i></b> | <b><i>Primer forward</i></b> | <b><i>Primer reverse</i></b> | <b><i>Lunghezza (bp)</i></b> | <b><i>Condizioni di PCR</i></b> |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 1                       | CCAAGTATTTTCAGCCCCAG         | ACACTCTCCGCCCGCCGAGG         | 220                          | 55°C x 30" 30 cicli             |
| 2.1                     | GGGTGGCTTCTGTGAGTTGA         | CCCAGAGCAGGGCCAGTG           | 195                          | 63°x30" 33 cicli                |
| 2.2                     | GTCTGTTGTCCACGCTGCT          | ACCACCTTGATGCTGCTG           | 217                          | 57°x30" 33 cicli                |
| 2.3                     | ATCCGCACCTTCTGCAAC           | CTGGGCCGTCTTTTCTTTCT         | 251                          | 55°x30" 30 cicli                |

**Tabella 3:** *Primer e condizioni di PCR di hCAV3*

Il gene **hMiRPI** (Ensembl:ENSG00000159197) è stato analizzato dividendo in due il suo unico esone. Per ciascun amplicone sono state messe a punto le condizioni ottimali di amplificazione qui di seguito riportate:

| <b><i>Amplicone</i></b> | <b><i>Primer forward</i></b> | <b><i>Primer Reverse</i></b> | <b><i>Lunghezza (bp)</i></b> | <b><i>Condizioni di PCR</i></b> |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 1.1                     | CCTTGTTGCGCTATTTTATTA        | GCCACGATGATGAAAGAGA          | 267                          | 51°x30"x35 cicli                |
| 1.2                     | CTGAGAACTTCTACTATGTCA        | GGACGTCAGATGTTAGCTTG         | 275                          | 51°x30"x35 cicli                |

**Tabella 4:** *Primer e condizioni di PCR di hMiRPI*



Il gene **hFLNA** (Ensembl:ENSG00000196924) è stato analizzato è stato suddiviso in quattro ampliconi, comprendenti le ripetizioni 23 e 24 intercalate dallo Hinge 2, regione di interazione con HCN1 (Gravante *et Al.*,2004). Per ciascun amplicone sono state messe a punto le condizioni ottimali di amplificazione qui di seguito riportate:

| Amplicone | Primer forward       | Primer Reverse      | Lunghezza (bp) | <b>Condizioni di PCR</b> |
|-----------|----------------------|---------------------|----------------|--------------------------|
| FLNA 44   | CACAGCATGACTCCCTGCTC | AAGGGCCTAGCAGCTGTG  | 297            | 63°C x 30" x 30          |
| FLNA 45   | GTCTGGCTCTGCCTGACCT  | GGGCAGATGCCAATAGCTT | 344            | 67°C x 30" x 30          |
| FLNA 46   | CTCTTAGCCCCACCCACTCT | CTGGCCATCCTGTGATTCT | 254            | 58°C x 30" x 30          |
| FLNA 47   | GGGACTGAGGACCCCTCTT  | AAGAGGGCGGGGCTGCTT  | 302            | 57°C x 30" x 30          |

**Tabella 4:** *Primer e condizioni di PCR di hFLNA*

## Valutazione qualitativo-quantitativa della reazione di PCR

Per verificare la resa del processo e le dimensioni dei frammenti ottenuti, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1% a cui è stato aggiunto bromuro di etidio (0,5 µg/ml) per visualizzare i frammenti di DNA. La polvere di agarosio è stata sciolta in soluzione tampone TAE 1X (Tris Base 40 mM, EDTA 1 mM, acido acetico 20 mM, pH8), soluzione utilizzata anche come tampone di corsa. 3 µl di ciascun campione sono stati diluiti in 7 µL di acqua Milli-Q® purificata e deionizzata (Millipore™ Corporation) e 2 µL di *Loading dye* (6X) (Fermentas™) e caricati uno per ogni pozzetto. Al fine di valutare la lunghezza del frammento amplificato, è stato caricato, parallelamente ai campioni, il ladder da 100 bp (*GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* della Fermentas™) in ragione di 1 µL diluito in 9 µL di H2O Milli-Q® e 2 µL di *Loading dye* (6X) (Fermentas™). La corsa elettroforetica è stata effettuata a circa 90-100 V per 20-40 minuti a temperatura ambiente. A fine corsa, il gel viene letto a 260 nm su

transilluminatore UV *TCX-20-M* (Euroclone™).

## **Analisi dei frammenti amplificati**

Per lo screening genetico sono state utilizzate due tecniche di analisi:

- ***Single Strand Conformation Polymorphysm*** (SSCP)

tecnica elettroforetica che permette di discriminare eventuali sostituzioni nucleotidiche evidenziandole sotto forma di patterns elettroforetici differenti rispetto al campione wild-type.

- ***Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*** (DHPLC)

tecnica cromatografica parzialmente denaturante che permette di identificare singole sostituzioni nucleotidiche o piccole inserzioni e/o delezioni in regioni amplificate di un gene.

## SSCP

La SSCP è una tecnica di biologia molecolare in grado di evidenziare eventuali cambiamenti di base nel singolo filamento di DNA rispetto ad un campione wild type. La tecnica consiste nell'elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide di campioni di DNA a singolo filamento, cui fa seguito una fase di colorazione argintica del gel. I singoli filamenti di DNA sono in grado di formare strutture secondarie direttamente dipendenti dalla propria sequenza nucleotidica. La corsa attraverso le maglie del gel permette la separazione dei diversi pool conformazionali: differenze puntiformi a livello della sequenza nucleotidica si riflettono sulla conformazione secondaria che il filamento assume, e quindi sulla sua capacità di migrare attraverso le maglie del gel. La successiva colorazione del gel permette di discriminare, grazie al confronto dei pattern di corsa dei campioni, i profili wild type da quelli mutati. La tecnica ha un'accuratezza dell'85% se i frammenti in analisi sono di lunghezza compresa tra le 200 e le 300 paia di basi. La formazione del gel di poliacrilammide prevede la reazione di monomeri di acrilammide con bis-acrilammide (un agente in grado di stabilire i legami crociati tra le molecole di acrilammide, fondamentale per la polimerizzazione), ammonio persolfato (iniziatore della reazione) e TEMED (catalizzatore della reazione di polimerizzazione). La reazione di polimerizzazione richiede circa un'ora.

I reagenti utilizzati per la polimerizzazione sono stati:

- 80 mL di soluzione di acrilammide al 6%
- 40 µL di TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) al 99%
- 800 µL di soluzione di APS (ammonio persolfato) al 10%

La soluzione di acrilammide al 6% è stata così composta:

- 200mL di poliacrilammide 30% (295,2 g di acrilammide + 4,65 g di bis-acrilammide + H<sub>2</sub>O Milli-Q® a volume di 1 L)
- 100 mL TBE 10X (108 g di TRIS + 55 g di acido borico + 40 mL di EDTA 0,5 M pH 8 + H<sub>2</sub>O Milli-Q® a volume di 1 L)
- H<sub>2</sub>O Milli-Q® a volume di 1 L

Il buffer utilizzato per la corsa è 1 L di TBE 1X ottenuto per diluizione dallo stock 10X.

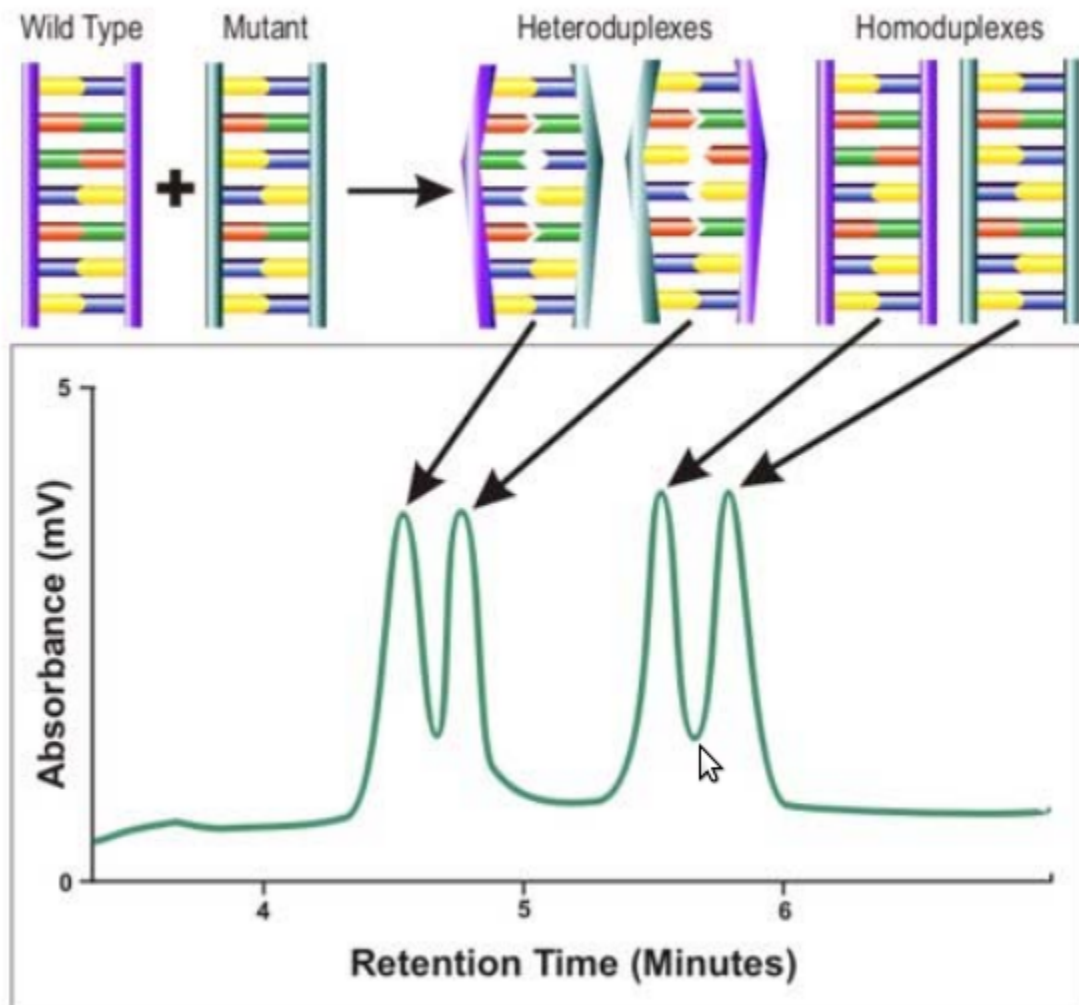
Al prodotto di PCR è stata aggiunta una soluzione denaturante in proporzione alla quantità di DNA ottenuto dalla PCR (da 10 a 20  $\mu$ L), e così composta: 50 mL di formammide (agente denaturante), 1 mL di EDTA 0,5 M pH 8, xilene cianolo 0,1%, blu di bromo fenolo 0,1% (colorante per seguire la corsa elettroforetica). Il campione così preparato è stato denaturato a 95°C per 10 minuti e caricato nell'apparato per elettroforesi (*Hoefer SQ3 Sequencer*, Amersham Biosciences™). Lo strumento permette l'analisi di 32 campioni per corsa. Per ogni pozzetto è stato caricato un volume di campione variabile in base alla quantità di DNA ottenuto dalla reazione di PCR: da un minimo di 5  $\mu$ L ad un massimo di 16  $\mu$ L (capienza massima del pozzetto). La corsa è stata condotta a temperatura ambiente, a 25-30 W di potenza per una durata di 3-4 ore. Alla corsa è seguita la fase di colorazione del gel secondo la seguente modalità:

- 5 minuti in etanolo al 10%
- rimozione dell'etanolo
- 3 minuti in acido nitrico all'1%
- rimozione dell'acido nitrico e risciacquo con acqua distillata
- 15-20 minuti in nitrato d'argento 12 mM
- rimozione del nitrato d'argento e risciacquo con acqua distillata
- soluzione di carbonato di sodio 0,28 M addizionata con 480  $\mu$ L di formaldeide 37% fino alla comparsa delle bande di DNA
- rimozione della soluzione di carbonato di sodio
- 2 minuti in acido acetico al 10%
- rimozione dell'acido acetico e risciacquo con acqua distillata

Il gel è stato ricoperto con carta cromatografica 3MM (Whatman™) e pellicola trasparente e deidratato su apparato *Slab Gel Drier Hoefer* (Amersham Biosciences™) per 15 minuti a 70°C.

## DHPLC

La DHPLC è una tecnica cromatografica condotta in condizioni parzialmente denaturanti e viene utilizzata per analisi genetiche volte a rilevare possibili polimorfismi attraverso la discriminazione di molecole di DNA eteroduplex da molecole di DNA omoduplex. Un frammento di DNA eteroduplex si forma quando un frammento di DNA mutato ed uno wild-type vengono denaturati termicamente e poi lasciati rinaturare, allo stesso modo se entrambi i frammenti sono wild-type si ottiene un DNA omoduplex. La DHPLC impiega il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (IP-RP HPLC). La fase stazionaria (contenuta nella colonna) è costituita da polimeri C18 alchilati di polistirene-divinilbenzene (*DNASep*®, *Transgenomic*®), mentre la fase mobile è una miscela di due soluzioni, A e B: la soluzione A è TEAA (trietil-ammonioacetato, 100 mM a pH 7), la soluzione B è TEAA (100 mM) e ACN (acetonitrile al 25%) il tutto a pH 7. Il TEAA è una molecola dotata di una componente apolare e di una polare (carica positivamente) e permette l'interazione tra le molecole di DNA e la fase stazionaria della colonna fungendo da ponte. L'acetonitrile è un solvente organico che compete col DNA nel legame al TEAA e quindi alla resina: l'utilizzo di un gradiente di ACN porta all'eluizione dei frammenti di DNA dalla colonna in tempi diversi in base alla loro specifica sequenza. La particolarità della tecnica è la termostatazione della colonna a temperature di parziale denaturazione per i frammenti in analisi: essa porta alla parziale separazione della doppia elica di DNA nell'eteroduplex evidenziandone un eventuale mismatch. Le regioni parzialmente disappaiate hanno una minore densità di gruppi fosfato e, quindi, una minore densità di carica rispetto al doppio filamento, determinando una minore ritenzione della molecola sulla fase stazionaria e un tempo di eluizione inferiore a quello dell'omoduplex.



**Figura 1:** Individuazione di mutazioni tramite DHPLC. La denaturazione e rinaturazione dei frammenti ottenuti tramite PCR porta alla formazione di due eteroduplex e due omoduplex, che risultano come quattro picchi differenti alla lettura dello spettrofotometro. Più tipicamente si riscontrano due picchi, corrispondenti alla coppia di eteroduplex e a quella di omoduplex

Il gradiente di acetonitrile porta quindi l'eluizione dei frammenti in maniera sequenza dipendente, poiché si lavora in condizioni parzialmente denaturanti; per primo viene eluito l'eventuale DNA a singola elica, poi quello parzialmente denaturato (eteroduplex) e infine il doppio filamento (omoduplex). L'eluizione del DNA viene monitorata da un sistema spettrofotometrico, corredato di microcella a flusso, che rileva in continuo l'assorbanza a 260 nm. L'apparecchiatura DHPLC comprende i seguenti elementi:

- colonna cromatografica
- piastra di caricamento dei campioni
- sistema di iniezione del DNA
- rivelatore spettrofotometrico
- pompa che assicuri un flusso costante di 900  $\mu\text{L}/\text{minuto}$

I campioni da analizzare e il corrispettivo wild-type sono stati amplificati per lo specifico amplicone e successivamente miscelati in rapporto 1:1 (20 µL di campione da analizzare + 20 µL di campione certamente wild-type). La mix così ottenuta è stata denaturata a 95°C per 10 minuti. Dopo rinaturazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati caricati su *Wave® System 3500* (Transgenomic®) per l'analisi DHPLC.

Tramite il software *Navigator™* (Transgenomic®) è stata implementato un protocollo di analisi comprendente un numero di corse sufficiente alla caratterizzazione dell'intero amplicone in esame: ciascuna corsa viene condotta ad una determinata temperatura (temperatura di parziale denaturazione) calcolata in base alla specifica sequenza dell'amplicone.

Circa 8 µL del campione vengono caricati, insieme al tampone di corsa, nella colonna termostata alla prima temperatura d'analisi: se il campione oggetto dell'analisi è wild-type il cromatogramma mostrerà un solo picco (un unico tempo di eluizione), ulteriori picchi segnalano la presenza di una mutazione, che dovrà essere confermata mediante sequenziamento.

Terminata l'analisi per la prima temperatura di denaturazione viene effettuato un lavaggio della colonna con una soluzione al 75% di ACN per rimuovere eventuali contaminazioni ancora legate alla resina, preparandola così per la successiva temperatura di analisi; la colonna viene equilibrata con tampone 50 % A e 50 % B.

# Purificazione

Il processo di purificazione è volto all'isolamento del DNA amplificato da ciò che resta della mix di PCR e dagli eventuali piccoli frammenti aspecifici. Nel caso di grossi frammenti di aspecifico è necessario procedere al taglio della banda di interesse su gel d'agarosio e quindi alla sua purificazione.

## **La purificazione del prodotto di PCR prevede il seguente protocollo:**

- Aggiungere al prodotto di PCR un volume di buffer NT due volte superiore a quello del campione
- Caricare la soluzione ottenuta in una NucleoSpin® Extract II column inserita in un tubo di raccolta e centrifugare per 1 minuto a 11000 g
- Rimuovere l'eluato e riposizionare la colonna nel tubo di raccolta
- Aggiungere nella colonna 600 µL di buffer NT3 e centrifugare per 1 minuto a 11000 g
- Rimuovere l'eluato e riposizionare la colonna nel tubo di raccolta
- Centrifugare per 2 minuti a 11000 g per rimuovere il buffer rimasto
- Rimuovere il tubo di raccolta e posizionare la colonna in una provetta da 1,5 mL
- Aggiungere dai 15 ai 50 µL di acqua Milli-Q® direttamente sul filtro facendo attenzione a non toccarlo e lasciare incubare a temperatura ambiente per 1 minuto
- Centrifugare per 1 minuto a 11000 g
- Conservare il campione a +4°C

## **La purificazione della banda da gel d'agarosio prevede il seguente protocollo**

- Sciogliere la banda tagliata in Buffer NT (200 µL di buffer ogni 100 µg di gel)
- Caricare la soluzione ottenuta in una NucleoSpin® Extract II column inserita in un tubo di raccolta e centrifugare per 1 minuto a 11000 g
- Rimuovere l'eluato e riposizionare la colonna nel tubo di raccolta
- Aggiungere 600 µL di buffer NT3 e centrifugare per 1 minuto a 11000 g
- Rimuovere l'eluato e riposizionare la colonna nel tubo di raccolta
- Centrifugare per 2 minuti a 11000 g per rimuovere il buffer rimasto
- Rimuovere il tubo di raccolta e posizionare la colonna in una provetta da 1,5 ml
- Aggiungere dai 15 ai 50 µL di acqua Milli-Q® direttamente sul filtro facendo attenzione a non toccarlo e lasciare incubare a temperatura ambiente per 1 minuto
- Centrifugare per 1 minuto a 11000 g
- Conservare il campione a +4°C

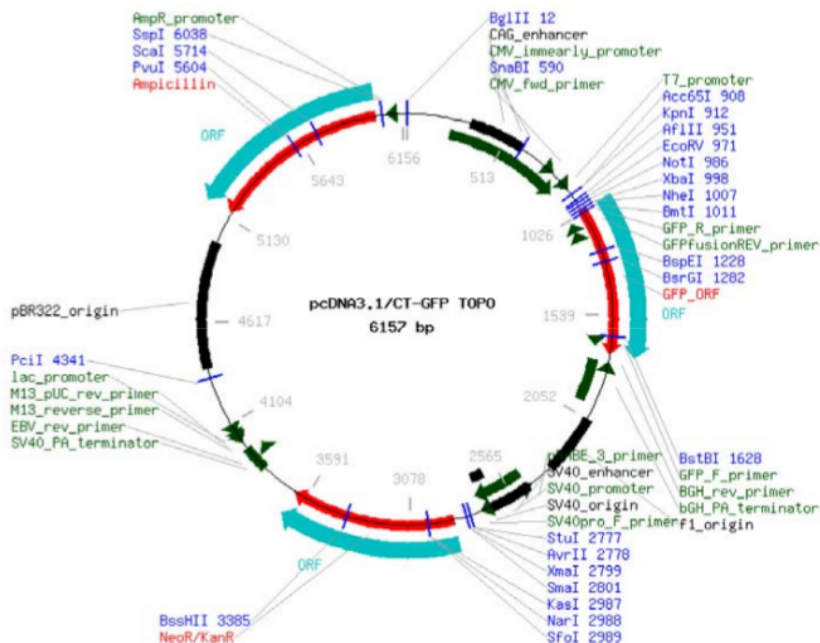


## Sequenziamento

Al fine di confermare ed identificare le anomalie rilevate durante l'analisi genetica è stato necessario procedere al sequenziamento degli ampliconi di interesse e per questo ci siamo avvalsi del servizio offerto dalle ditte esterne Bio-Fab Research (Roma) ed Eurofins MWG Operon (Ebersberg). I campioni vengono preparati in maniera differente in base alla propria lunghezza: la Bio-Fab Research richiede 13 ng di DNA per le prime 100 bp e 10 ng per ogni 100 pb successive, si aggiungono 10 pmoli dei rispettivi primer in un volume finale di 20  $\mu$ L; la Eurofins MWG Operon richiede 30 ng di DNA per campioni di lunghezza compresa tra 150 e 300 bp e 30 pmol dei rispettivi primer in un volume finale di 15  $\mu$ L.

## Creazione del plasmide recante la mutazione C233T (T78M)

Come vettore di clonaggio per il gene *wild type* CAV3 è stato usato il plasmide pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO (Invitrogen™) (fig 27). Il plasmide ricombinante pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO + cDNA hCAV3 *wild type* (Tab. 4) contenente la sequenza cDNA del gene umano CAV3 è stato gentilmente concesso dal dott. M. Vatta (PhD, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA).



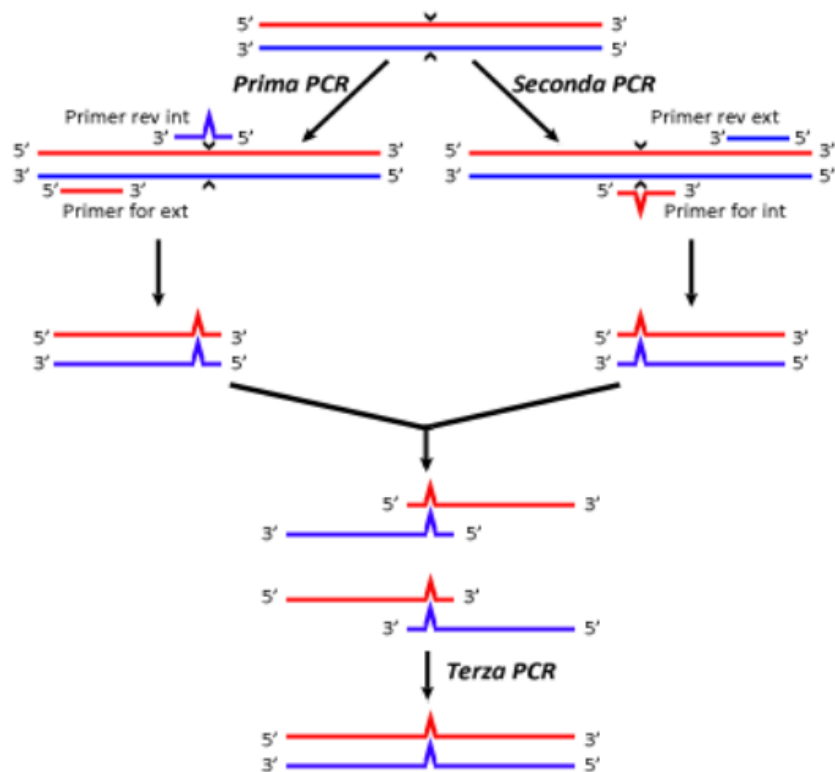
**Figura 2:** Schema del vettore plasmidico pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO (Invitrogen™)

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1            | GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 707          | TTTGTTTGG <b>CACCAAAATCAACGGGACTT</b> TCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|              | AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|              | ACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 901          | TAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTGCCCTT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| cDNA<br>CAV3 | ATGATGGCAGAAGAGCACACAGATCTCGAGGCCAGATCGTCAAGGATATCCACTGCAAG<br>GAGATTGACCTGGTGAACCGAGACCCCAAGAACATTAACGAGGACATAGTCAAGGTGGAT<br>TTTGAAGACGTGATCGCAGAGCCTGTGGGCACCTACAGCTTTGACGGCGTGTGGAAGGTG<br>AGCTACACCACCTTCACTGTCTCCAAGTACTGGTGCTACCG <b>TCTGTTGTCCA</b> <b>CGCTGCT</b> GG<br>GCGTCCCCTGCGCCCTGCTCTGGGGCTTCTGTTTCGCTGCATCTCCTTCTGCCACATCTG<br>GGCGGTGGTGCCATGCATTAAGAGCTACCTGATCGAGATCCAGTGCATCAGCCACATCTAC<br>TCACTCTGCATCCGCACCTTCTGCAACCCACTCTTCGCGGCCCTGGGCCAGGTCTGCAGCA<br>GCATCAAGGTGGTGCTGCGGAAGGAGGTC |
| 954          | AAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAATGGCTAGCAAAGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|              | AGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 1083         | AATTTTCTG <b>TCAGTGGAGAGGGTGAAGG</b> TGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 6094         | TATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

**Tabella 5:** Sequenza del plasmide ricombinante pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO + cDNA hCAV3 wild type. In **bold** la sequenza cDNA del gene CAV3 umano.

La mutazione nucleotidica C233T (che nella proteina Cav3 porta al cambio aminoacidico T78M) è stata introdotta nel gene CAV3 del plasmide ricombinante attraverso l'amplificazione del segmento di interesse utilizzando primers mutati (Tab. 3):

- una prima PCR è stata eseguita utilizzando i primers *forward ext* **CACCAAAATCAACGGGACTT** e *reverse int* AGCAGC**A**TGGACAACAGA (recante la mutazione 3'→5' Guanina in **A**denina) per amplificare la sequenza a monte del sito di interesse (compreso)
- una seconda PCR è stata eseguita utilizzando i primers *forward int* TCTGTTGTCCA**T**GCTGCT (recante la mutazione 5'→3' Citosina in **T**imina) e *reverse ext* **CCTTACCCTCTCCACTGA** per amplificare la sequenza a valle del sito di interesse (compreso)
- i due prodotti di PCR sono stati purificati da gel (vedi Pag. 43 'Purificazione') e per mezzo di una terza PCR sono stati uniti in un'unica sequenza, delimitata dai due primers ext.



**Figura 3:** Schema della mutagenesi sito specifica utilizzando il metodo delle tre PCR

Il frammento così ottenuto è stato purificato da gel e quindi processato con due endonucleasi di restrizione per produrre le *sticky ends* necessarie all'inserzione nel vettore di clonaggio:

- il primo taglio è stato effettuato utilizzando l'enzima NotI (Fermentas®) a 37°C per 1 ora (NotI riconosce la sequenza 5'-GC▼GGCCGC-3' e complementare 3'-CGCCGG▼CG-5')
- il secondo taglio è stato effettuato sul frammento precedentemente tagliato e purificato da gel con l'enzima KpnI (New England Biolabs®) a 37°C per 1 ora (KpnI riconosce la sequenza 5'-GGTAC▼C-3' e complementare 3'-C▼CATGG-5')

Gli stessi enzimi NotI e KpnI sono stati impiegati per effettuare i tagli nel costrutto plasmidico contenente il gene CAV3 *wild type*. Il frammento contenente la mutazione è stato quindi inserito nel plasmide e la ligazione è stata effettuata utilizzando la DNA ligasi T4 (Invitrogen™).

## Trasformazione batterica

Per ottenere un elevato numero di copie del plasmide ricombinante pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO + cDNA hCAV3 *mutant*, recante la mutazione C233T (T78M), è stato necessario utilizzare come cellule ospiti i batteri competenti E. coli XL1-Blue (ceppo batterico ampicillina sensibile -*ampS*- già reso competente con trattamento CaCl<sub>2</sub> e conservato a -80°C in aliquote di 200 µL). Il plasmide ricombinante contiene un marcatore selettivo che conferisce alla cellula batterica la resistenza all'antibiotico ampicillina (*ampR*). Per la trasformazione è stata scongelata un'aliquota da 100 µL di E. coli XL1-Blue, posti in una provetta da 15 mL pre-raffreddata in ghiaccio. I passaggi di trasformazione delle cellule batteriche hanno previsto:

1. aggiunta di 10 µL del prodotto di ligazione alle cellule
2. incubazione in ghiaccio per 30 minuti
3. shock termico: incubazione a 42°C per 45 secondi in un bagnetto termostato, seguita da passaggio in ghiaccio per 1 minuto
4. aggiunta di 0,9 mL di terreno di crescita LB medium (Sigma-Aldrich®) senza antibiotico
5. incubazione in agitazione (200-220 rpm) a 37°C per 1 ora (tempo di espressione del gene *ampR*)
6. trasferimento di 100 µL di cellule su piastra Petri (Ø = 100 mm) con terreno di crescita LB-agar addizionato con ampicillina diluita 1:1000 (da stock 50 µg/mL)
7. incubazione della piastra capovolta in termostato a 37°C *overnight*.

## **Selezione del clone batterico contenente il DNA plasmidico ricombinante corretto (cracking) e sua espansione**

Per confermare la corretta inserzione della mutazione nel plasmide è stato necessario procedere al *cracking* batterico: le singole colonie sono state prelevate dalla piastra e successivamente risospese in una eppendorf con acqua MilliQ e in una falcon contenente terreno ed antibiotico, per la successiva espansione del clone corretto. La provetta *eppendorf* è stata trattata con la soluzione di *cracking* al fine disgregare i batteri per liberare il DNA genomico e il plasmide.

Il contenuto della eppendorf è stato caricato su gel per verificare la presenza del plasmide mutante.

Il DNA plasmidico è stato quindi purificato da gel e sequenziato secondo metodo Sanger (Bio-Fab Research™, Roma).

## Estrazione del DNA plasmidico

Per estrarre il DNA plasmidico dal clone batterico selezionato è stato utilizzato il kit di purificazione NucleoSpin® Plasmid Mini prep (Macherey-Nagel®) secondo il seguente protocollo:

- centrifugare le colture batteriche a circa 4000 x g per 10-15 minuti
- scartare il surnatante di terreno in eccesso e risospende il pellet batterico in 250 µL di buffer A1 trasferendo poi il tutto in provette da 1,5 mL
- aggiungere 250 µL di buffer A2 e risospendere invertendo la provetta per 6-8 volte delicatamente
- incubare a temperatura ambiente per 5 minuti
- 
- centrifugare a 11000 x g per 10 minuti
- recuperare il surnatante e trasferirlo in una colonnina di purificazione (NucleoSpin™ Plasmid Column) dotata di provetta di raccolta.
- centrifugare a 11000 x g per 1 minuto e scartare il liquido dalla provetta di raccolta
- aggiungere in colonnina 600 µL di buffer A4 (preaddizionato con etanolo)
- centrifugare a 11000 x g per 1 minuto e scartare il liquido dalla provetta di raccolta
- per asciugare la membrana dai residui di buffer, centrifugare a 11000 x g per 2 minuti
- trasferire la colonnina in una nuova provetta da 1.5 mL
- aggiungere in colonnina 30-50 µL di acqua MilliQ lasciando in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto
- centrifugare a 11000 x g per 1 minuto per eluire il DNA plasmidico legato alla membrana di silice della colonnina

## Trasfezione

Come sistema eterologo per lo studio di espressione *in vitro* della mutazione T28M sono state utilizzate

cellule renali embrionali umane (HEK 293, *Human Embryonic Kidney 293 cells*) che non esprimono in maniera endogena il canale HCN4 e la proteina CAV3.

Le cellule HEK 293 sono state coltivate in un terreno costituito da DMEM +GlutaMAX (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen™), addizionato con 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Invitrogen™) e 1% di Pen-Strep (penicillina 100 U/mL, streptomicina 0,1 mg/mL) (Sigma-Aldrich®). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37° C con una percentuale di CO2 al 5%. Il giorno prima della trasfezione le cellule vengono staccate dalla piastra con tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM) e ripiastrate ad una densità di 4x10<sup>5</sup> in 2 mL di terreno in due piastre Petri da 35 mm di diametro. L'esperimento di trasfezione transiente su cellule HEK 293 è stato effettuato seguendo il protocollo standard del sistema FuGENE® HD (Roche®) ed utilizzando il reagente in un rapporto di 3:1 rispetto al DNA plasmidico. Le cellule HEK 293 sono state co-trasfettate con due diversi plasmidi, uno contenente il canale HCN4 *wild type* (pcDNA 1.1) e l'altro contenente il gene CAV3 (pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO + cDNA hCAV3 *wild type* per la prima piastra, pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO + cDNA hCAV3 *mutant* per la seconda piastra). Per ogni piastra da 35 mm contenente le cellule HEK 293 da trasfettare sono stati effettuati i seguenti passaggi:

- preparare una soluzione di DNA a concentrazione 0,02 µg/µL in terreno senza siero
- aggiungere *FuGENE® HD* in rapporto 3:1 rispetto al DNA
- agitare brevemente con vortex
- incubare per 5-10 minuti a temperatura ambiente
- aggiungere goccia a goccia la soluzione alla piastra di trasfezione

1a piastrina = vettore cDNA hCAV3 wild-type (1 µg) + vettore cDNA HCN4 wild-type (1 µg)

2a piastrina = vettore cDNA hCAV3 mutante (1 µg) + vettore cDNA HCN4 wild-type (1 µg)

Le piastre così ottenute sono state mantenute in incubatore a 37°C (CO2 al 5%) *overnight*.

## Immunofluorescenza

Il protocollo utilizzato prevede due sciacqui dei campioni con PBS, dopo aver eliminato il terreno di coltura. In seguito si effettua una fissazione chimica del campione allo scopo di preservarlo e stabilizzarlo mantenendone inalterata la struttura. Le cellule HEK vengono fissate con paraformaldeide 2% (Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente. Con questo passaggio le cellule vengono protette da danni osmotici e si impedisce la solubilizzazione dell'antigene, mantenendolo nella posizione originaria e rendendolo accessibile all'anticorpo primario.

Viene effettuato un ulteriore sciacquo in PBS, per eliminare eventuali residui di fissativo, a cui seguono

due lavaggi da dieci minuti ciascuno con una soluzione di PBS + Glicina 0.1M (Sigma), per inattivare i gruppi aldeidici liberi del fissativo ed eliminare l'autofluorescenza dovuta alla paraformaldeide. Si procede successivamente con la permeabilizzazione della membrana con TRITON X-100, un detergente blando, e con il blocco dei siti aspecifici. I passaggi di permeabilizzazione e di blocco vengono effettuati insieme con una soluzione di PBS + BSA 1% (Sigma) + TRITON X-100 0,3% (Sigma) + SIERO 10% (Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente. È importante bloccare i siti aspecifici ai quali gli anticorpi primari e secondari possono legarsi mediante interazioni idrofobiche, in quanto si potrebbero ottenere falsi segnali. Per bloccare i siti aspecifici dell'anticorpo primario si usano soluzioni ad elevato contenuto proteico, in questo caso si utilizza la BSA (Bovine Serum Albumin), mentre per bloccare i siti aspecifici dell'anticorpo secondario si usa il siero pre-immune dell'animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario.

In seguito si procede con l'incubazione con anticorpo primario diluito in una soluzione composta da PBS + BSA 1% (Sigma) + SIERO 2% (Sigma). L'incubazione avviene overnight, in camera fredda ( 4°C ) e i campioni sono tenuti in una camera umida per evitare un'eventuale disidratazione.

Passata la notte si procede con tre lavaggi in PBS da dieci minuti l'uno per eliminare l'anticorpo primario in eccesso; in seguito viene effettuata l'incubazione con l'anticorpo secondario diluito in una soluzione composta da PBS + BSA 1% (Sigma) + SERUM 2% (Sigma). L'incubazione con l'anticorpo secondario viene effettuata per un'ora, a temperatura ambiente, al buio e in camera umida.

Si elimina l'anticorpo secondario in eccesso con tre lavaggi in PBS da dieci minuti l'uno, in seguito si montano sulle piastrine i vetrini coprioggetto utilizzando il montante Vectashield Mounting Medium for fluorescence (Vector) contenente glicerolo e DAPI, un intercalante fluorescente del DNA che permette di evidenziare i nuclei.

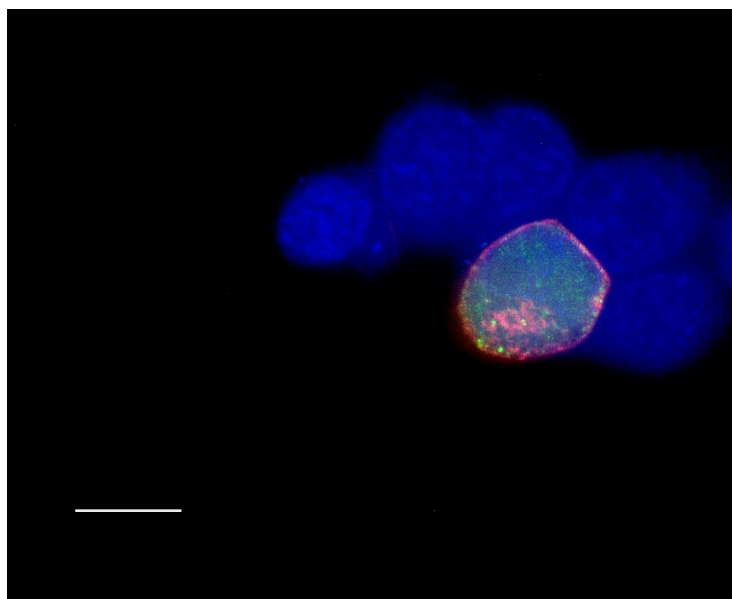
Sono stati eseguiti anche esperimenti di controllo in cui sono stati omessi gli anticorpi primari in modo da testare la specificità degli anticorpi secondari e nessun segnale di fluorescenza è stato rilevato.

| <i>Anticorpo primario</i>      | <i>Diluizione</i> | <i>Ditta produttrice</i> |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Rabbit anti-HCN4 (policlonale) | 1:100             | Alomone labs             |
| Chicken anti-GFP (policlonale) | 1:1500            | Abcam                    |

**Tabella 6:** *anticorpi primari*

| <i>Anticorpo secondario</i> | <i>Fluorocromo coniugato</i> | <i>Diluizione</i> | <i>Ditta produttrice</i> |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Donkey anti-rabbit          | Alexa Fluor 594              | 1:1000            | Molecular Probes         |
| Goat anti-chicken           | Alexa Fluor 488              | 1:1000            | Molecular Probes         |

**Tabella 7:** *anticorpi secondari*



**Immagine 1:** *cellula HEK 293 esprime hCAV3-T78M (verde) e hHCN4 (rosso). Barra di calibrazione 20  $\mu$ m.*



## Elettrofisiologia

L'analisi funzionale della mutazione T78M è stata condotta attraverso esperimenti di *patch clamp*. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le HEK sono state staccate con tripsina e ripiastrate in petri da 35 mm ad una confluenza sufficientemente bassa da ottenere cellule isolate.

Lo studio della corrente IHCN4 è stato effettuato con la tecnica del *patch clamp* in configurazione *whole-cell*. Le cellule in piastrina sono state poste sul piano di un microscopio ad inversione e perfuse con soluzioni fisiologiche per mezzo di un sistema in grado di garantire un rapido ricambio delle soluzioni sperimentali. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati a temperatura ambiente. Le cellule sono state inizialmente perfuse con una soluzione Tyrode a pH 7.4 così composta: NaCl 140 mM, KCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, D-glucosio 5,5 mM, HEPES-NaOH 5 mM. Per riempire le pipette di vetro borosilicato è stata utilizzata una soluzione intracellulare a pH 7.2 con la seguente composizione: K-aspartato 130 mM, NaCl 10 mM, EGTA-KOH 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, ATP (Na-salt) 2 mM, creatin fosfato 5 mM, GTP (Na-salt) 0,1 mM. Per la registrazione della corrente IHCN4 è stata utilizzata una soluzione extracellulare ad alto potassio (pH 7.4) costituita da NaCl 110 mM, KCl 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, HEPES-NaOH 5 mM, BaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM e NiCl<sub>2</sub> 100 mM).

I protocolli utilizzati per la stimolazione delle cellule sono stati generati attraverso un apposito software (Clampfit 9.2, Axon Instruments®), interfacciato con un convertitore analogico/digitale (Digidata 1322A, Axon Instruments®) connesso ad un amplificatore da *patch clamp* Axopatch 200 (Axon Instruments®). I dati sono stati analizzati utilizzando i software Clampfit 9.2 e Origin 8.0. La corrente IHCN4 è stata registrata tramite un protocollo di attivazione standard che prevede dei gradini iperpolarizzanti nell'intervallo tra -45 a -135 mV seguito da un gradino ad un potenziale di piena attivazione (-145 mV). Le curve di attivazione sono state ottenute dall'analisi delle correnti di coda normalizzate. Le curve di attivazione sono state interpolate con l'equazione di Boltzmann:

$$y = 1/(1 + \exp(V - V_{1/2}/s))$$

dove y indica la variabile di attivazione, V il potenziale test,  $V_{1/2}$  il valore di voltaggio al quale metà dei canali sono attivati e s l'*inverse slope factor* della curva di attivazione.

La densità di corrente è stata calcolata normalizzando l'ampiezza di corrente a -135 mV per la capacità

della cellula. I dati ottenuti sono stati presentati come media  $\pm$  S.E.M. (Standard Error of the Mean). Le differenze statistiche sono state valutate mediante il test t di Student per popolazioni indipendenti. Il livello di significatività statistica è stato fissato a  $p = 0,05$ .

# RISULTATI

## Screening di hCAV3

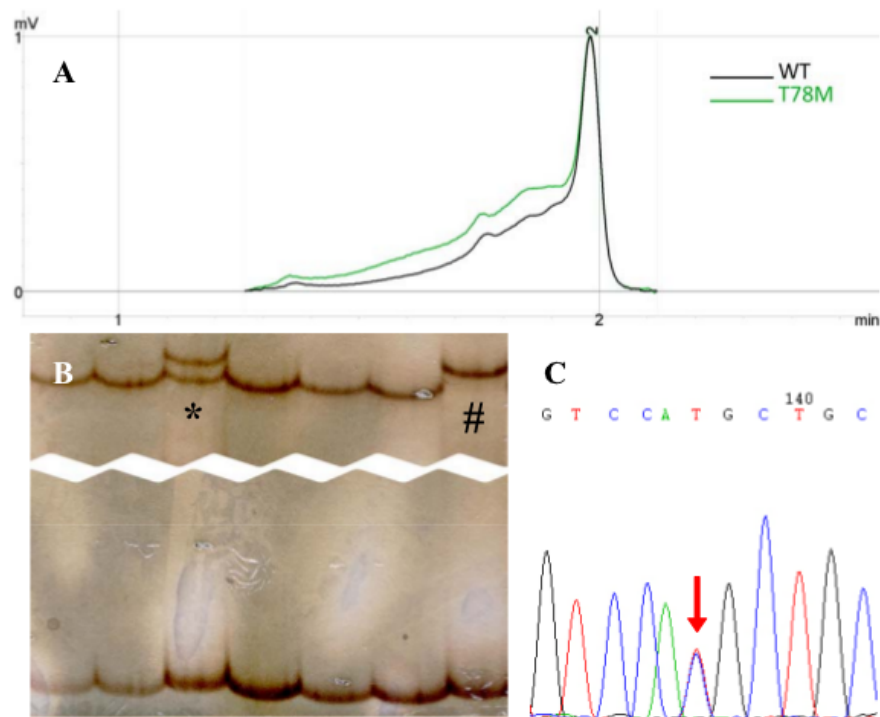
Per valutare la presenza di mutazioni o polimorfismi (SNP: *single-nucleotide polymorphism*) abbiamo suddiviso il gene *hCAV3* in quattro ampliconi che sono successivamente stati amplificati mediante PCR ed analizzati mediante le tecniche di SSCP e DHPLC. L'analisi genetica ha portato all'identificazione dei polimorfismi sinonimi L9L, N33N, F41F, V57V e S68S e del polimorfismo con cambio aminoacidico T78M. Tutti i polimorfismi sono presenti in eterozigosi (Tab. 1).

| Esone | Cambio nucleotidico | Cambio amionoacidico | Funzione | Presenza dbSNP | Casi identificati | Controlli sani (n=209) |
|-------|---------------------|----------------------|----------|----------------|-------------------|------------------------|
| 1     | 27 C>T              | L9L                  | Sinonimo | Sì             | n.q.              | n.i.                   |
| 1     | 99 C>T              | N33N                 | Sinonimo | Sì             | n.q.              | n.i.                   |
| 2     | 123 T>C             | F41F                 | Sinonimo | Sì             | 3                 | n.i.                   |
| 2     | 171 G>A             | V57V                 | Sinonimo | Sì             | 1                 | n.i.                   |
| 2     | 204 C>A             | S68S                 | Sinonimo | Sì             | 2                 | n.i.                   |
| 2     | 233 C>T             | T78M                 | Missenso | Sì             | 9                 | 0                      |

**Tabella 1:** Varianti nucleotidiche individuate nel gene *hCAV3*; n.q.: non quantificato. n.i.: non indagato.

I polimorfismi L9L e N33N risultano avere lo stesso pattern di corsa in SSCP e spesso sono presenti contemporaneamente nello stesso individuo. Vista l'ampia diffusione dei due SNP nelle popolazioni, l'impossibilità tecnica di distinguerli e vista la valenza patologica di entrambi ritenuta inconsistente, si è scelto di non procedere al sequenziamento dei campioni. Questi due SNP sono situati nel dominio N-terminale e sono presenti nel database dell'NCBI. Gli altri SNP sinonimi sono anch'essi presenti nel database dell'NCBI e sono localizzati rispettivamente nel dominio N-terminale (F41F) e nello scaffolding domain (V57V e S68S); il primo è stato riscontrato in due soggetti deceduti per sindrome da morte improvvisa prenatale (SADS) ed uno affetto da tachicardia sinusale inappropriata; il secondo è stato riscontrato in un soggetto deceduto per SADS; il terzo è stato riscontrato in due soggetti deceduti per SADS. Vista la loro natura sinonima, si è deciso di non produrre ulteriori indagini. Nel caso di T78M, il

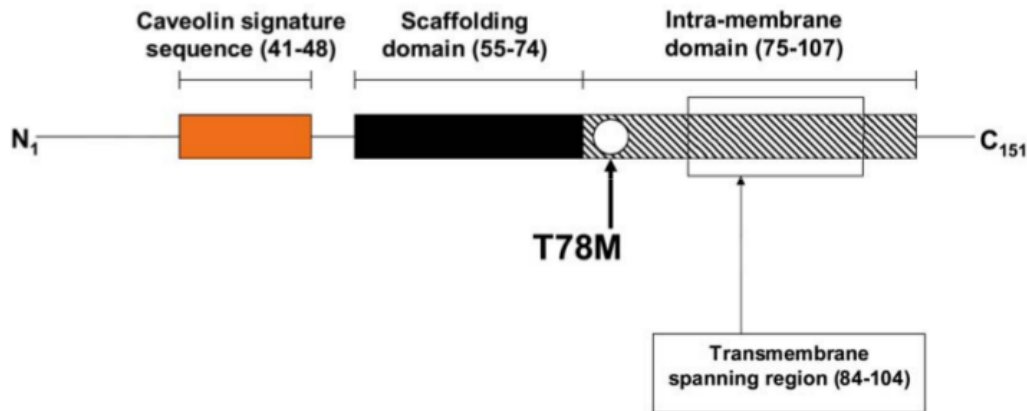
carattere non conservativo ci ha spinti ad approfondire l'indagine. In figura 1 viene mostrato un esempio di analisi cromatografica mediante DHPLC (A), corsa elettroforetica in SSCP (B) e cromatogramma risultante dal sequenziamento (C).



**Figura 1:** analisi cromatografica mediante DHPLC (A), corsa elettroforetica in SSCP (B) e cromatogramma risultante dal sequenziamento (C).

| <b><i>PAZIENTI</i></b> | <b><i>T78M</i></b> | <b><i>TOTALE</i></b> |
|------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>TSI</b>             | <b>4</b>           | <b>38</b>            |
| <b>BRA</b>             | <b>1</b>           | <b>107</b>           |
| <b>FAP</b>             | <b>2</b>           | <b>19</b>            |
| <b>SADS</b>            | <b>2</b>           | <b>37</b>            |
| <b>SIDS</b>            | <b>0</b>           | <b>4</b>             |
| <b>SUDS</b>            | <b>0</b>           | <b>21</b>            |
| <b>EPI</b>             | <b>4</b>           | <b>110</b>           |
| <b>CONTROLLI SANI</b>  | <b>0</b>           | <b>209</b>           |

**Tabella 2:** *Soggetti recanti la mutazione T78M in relazione alla popolazione di appartenenza.*



**Figura 2:** Schema della struttura di CAV3 con riferimento ai domini. T78M è rappresentata da un cerchio bianco all'interno del dominio intramembrana. (Da Cronk et Al., 2007).

Questo polimorfismo è già stato descritto in letteratura ed è presente nel database degli SNP dell'NCBI. Vista l'alta frequenza di T78M in diverse patologie, è ipotizzabile una sua correlazione con le stesse, si è deciso quindi di indagare in maniera più approfondita in questa direzione.

La popolazione controllo, formata da individui sani, utilizzata per confrontare la distribuzione del polimorfismo/mutazione è composta da 209 soggetti. In questo gruppo è stato cercato T78M con i metodi SSCP e DHPLC con esito negativo.

L'assenza del polimorfismo nella popolazione di controllo corrobora l'ipotesi di un'associazione tra la presenza di T78M e l'insorgenza di patologie del ritmo. Per verificare la solidità dell'ipotesi si è proceduto all'analisi statistica dei dati.

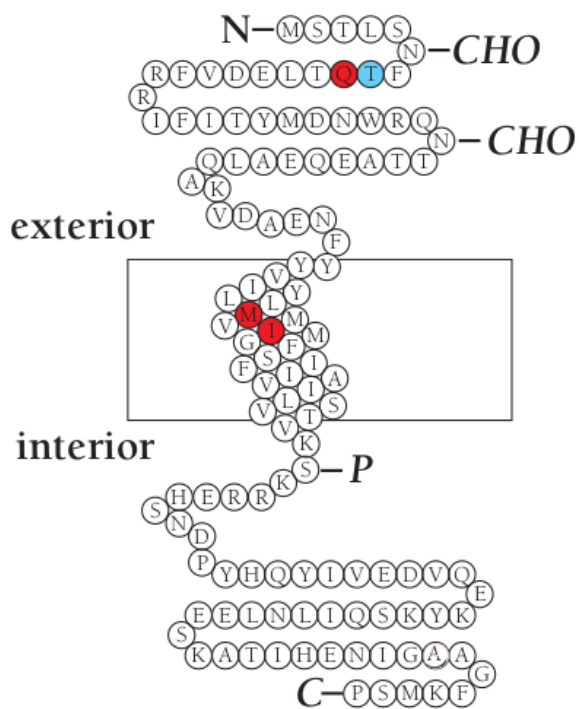
## Screening di hMiRP1

Allo stesso modo, abbiamo analizzato il gene umano *KCNE2* che codifica per la proteina MiRP1.

Abbiamo diviso il suo unico esone in due ampliconi che sono successivamente stati amplificati mediante PCR ed analizzati mediante le tecniche di SSCP e DHPLC. L'analisi genetica svolta ha portato all'identificazione dei polimorfismi non conservativi T8A, Q9E, M54T e I57T. Tutti i polimorfismi sono presenti nel database dell'NCBI e sono stati precedentemente descritti in relazione a casi di aritmia farmacoindotta (Sesti et Al. 2000). Nei pazienti sono presenti tutti in eterozigosi.

| Esone | Cambio Nucleotidico | Cambio Aminoacidico | Tipo     | Presenza dbSNP | Casi identificati | Controlli sani (n=230) |
|-------|---------------------|---------------------|----------|----------------|-------------------|------------------------|
| 1     | 22A>G               | T8A                 | Missenso | si             | 1                 | 2                      |
| 1     | 25C>G               | Q9E                 | Missenso | si             | 1                 | 0                      |
| 1     | T161>C              | M54T                | Missenso | si             | 1                 | 0                      |
| 1     | T170>C              | I57T                | Missenso | si             | 5                 | 3                      |

**Tabella 3:** Varianti nucleotidiche individuate nel gene *hMIRP1*;



**Figura 3:** Schema della struttura di *hMiRP1* con riferimento ai domini ed alla localizzazione dei polimorfismi (Da Abbott and Goldestain, 2001)

| <b>PAZIENTI</b>  | <b>T8A</b> | <b>Q9E</b> | <b>M54T</b> | <b>I57T</b> | <b>TOTALE</b> |
|------------------|------------|------------|-------------|-------------|---------------|
| <b>TSI</b>       | 0          | 0          | 0           | <b>2</b>    | 38            |
| <b>BRA</b>       | <b>1</b>   | 0          | 0           | 0           | 107           |
| <b>FAP</b>       | 0          | 0          | 0           | 0           | 19            |
| <b>SADS</b>      | 0          | 0          | 0           | 0           | 37            |
| <b>SIDS</b>      | 0          | 0          | 0           | 0           | 4             |
| <b>SUDS</b>      | 0          | <b>1</b>   | 0           | <b>1</b>    | 21            |
| <b>EPI</b>       | 0          | 0          | <b>1</b>    | <b>2</b>    | 110           |
| <b>CONTROLLI</b> | <b>2</b>   | 0          | 0           | <b>3</b>    | 230           |

**Tabella 4:** *Soggetti recanti i polimorfismi in MiRP1 in relazione alla popolazione di appartenenza.*

## Screening di hFLNA

Lo screening del gene *hFLNA* nella regione che comprende le ripetizioni 23 e 24 intercalate dall' Hinge 2, sede del dominio di interazione con HCN1 non ha mostrato alcuna anomalia di rilievo. Tutti i campioni si sono mostrati uguali al *wild type*. Sono stati analizzati soltanto i pazienti epilettici poichè solo HCN1 possiede il dominio di interazione con FLNA (Gravante *et Al.*, 2004). Inoltre HCN1 è scarsamente espresso a livello cardiaco (Shi *et Al.*, 1999; Santoro *et Al.*, 2000)



## Statistica

Per l'interpretazione statistica dei dati è stato utilizzato il *Test Esatto di Fisher*, un test di statistica non parametrica che permette di verificare l'esattezza dell'ipotesi iniziale per la quale si assume che l'osservazione di differenze nelle popolazioni considerate è dovuta al caso. Viene costruita una tabella di contingenza 2x2 (Tab. 8) all'interno della quale vengono collocati i dati in esame.

| Campione   | Polimorfismo | WT |
|------------|--------------|----|
| Malati     | a            | b  |
| Non Malati | c            | d  |

**Tabella 5:** *tabella di contingenza 2x2. a,b,c,d numero di individui.  $n=a+b+c+d$*

Gli individui sono divisi in base alla popolazione di appartenenza e alla presenza o meno del polimorfismo. La procedura di calcolo della probabilità effettuato dal test esatto di Fisher consiste nel calcolare la differenza tra dati osservati sperimentalmente e dati attesi esattamente come avviene nel calcolo del Chi quadro. L'utilizzo del Chi quadro non è consentito in una tabella come quella reale da noi riportata in quanto esso vale solo se tutti i numeri delle caselle sono maggiori di 2 (nel nostro caso abbiamo anche un valore di 0). In questi casi viene utilizzato il test esatto di Fisher. Inoltre, il test esatto di Fisher considera anche gli ipotetici casi nei quali la distribuzione degli eventi è più estrema di quella osservata, tali tabelle vengono costruite mantenendo inalterata la somma di righe e colonne andando a variare il valore più basso riducendolo di 1 fino ad arrivare a 0 (test ad una coda) e incrementandolo di 1 fino ad arrivare al valore massimo corrispondente alla somma delle celle che compongono la riga in esame (test a due code). Una volta costruite le tabelle dei casi estremi viene calcolato il loro valore di P, se risultano uguali o inferiori al valore di P della tabella reale vengono sommati.

Il test di Fisher utilizzato nel nostro studio è ad una coda poiché l'ipotesi alternativa all'ipotesi nulla afferma che la distribuzione di soggetti recanti il polimorfismi è maggiore nella popolazione di malati rispetto alla popolazione di controllo. Nel nostro studio non è stato possibile ipotizzare casi più estremi

dell'osservato, in quanto il valore più piccolo presente in tabella è già 0. La popolazione di controllo utilizzata nel calcolo del valore di P conta 209 soggetti per quanto riguarda la caveolina 3 e 230 per MiRP1.

| <b><i>PAZIENTI</i></b> | <b><i>T78M % sul campione</i></b> | <b><i>P-Value (P&lt;0.05)</i></b> |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>TSI</b>             | 10.53                             | 0.0005                            |
| <b>FAP</b>             | 10.53                             | 0.0066                            |
| <b>SADS</b>            | 5.41                              | 0.0221                            |
| <b>BRA</b>             | 0.93                              | Non significativo                 |
| <b>EPI</b>             | 3.63                              | 0.0146                            |

**Tabella 2:** percentuale di pazienti arrecante il polimorfismo T78M in caveolina 3, con relativo valore do P quando significativo

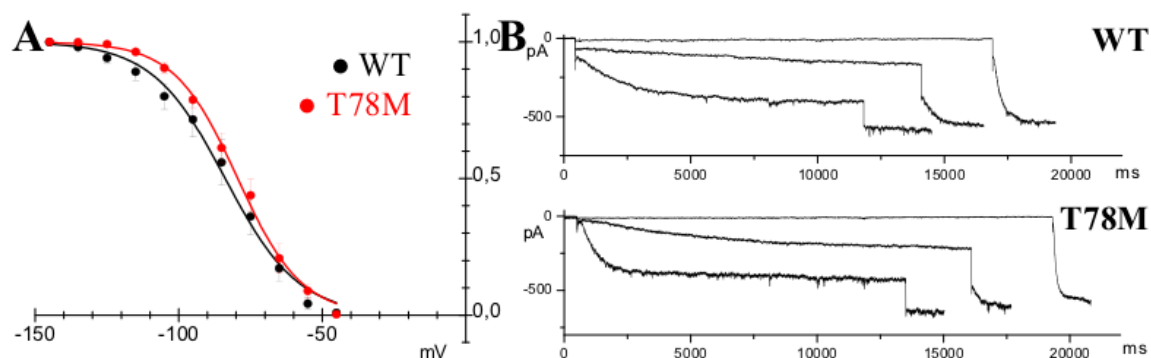
| <b><i>PAZIENTI</i></b> | <b><i>T8A<br/>% sul<br/>campione</i></b> | <b><i>Q9E<br/>% sul<br/>campione</i></b> | <b><i>M54T<br/>% sul<br/>campione</i></b> | <b><i>I57T<br/>% sul<br/>campione</i></b> |
|------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>TSI</b>             | 0                                        | 0                                        | 0                                         | 5.26                                      |
| <b>FAP</b>             | 0                                        | 0                                        | 0                                         | 0                                         |
| <b>SUDS</b>            | 0                                        | 4.76                                     | 0                                         | 2.63                                      |
| <b>BRA</b>             | 0.93                                     | 0                                        | 0                                         | 0                                         |
| <b>EPI</b>             | 0                                        | 0                                        | 0.90                                      | 5.26                                      |
| <b>CONTROLLI</b>       | 0.86                                     | 0                                        | 0                                         | 1.30                                      |

**Tabella 3:** percentuale di pazienti arrecante i polimorfismi in MiRPI.

Nelle tabelle 2 e 3 sono riportate le percentuali di pazienti recanti il polimorfismo T78M nella caveolina 3, i polimorfismi T8A, Q9E, M54T ed I57T in MiRP1 e, se significativo, il valore di P. L'associazione tra il polimorfismo T78M e le patologie risulta statisticamente significativa nei pazienti affetti da tachicardia sinusale (TSI), fibrillazione atriale parossistica (FAP), nei feti deceduti per sindrome da morte improvvisa prenatale (SADS) e negli epilettici (EPI). Nessun polimorfismo in MiRP1 risulta statisticamente significativo per quanto riguarda la correlazione a patologie.

## Elettrofisiologia

Sebbene T78M sia stata indicata come responsabile dell'aumento di  $I_{Na}$ , e legata alla LQTS di tipo 9 ed ai casi di SIDS (Cronk et Al., 2007; Wainger et Al., 2001) i fenotipi in cui il nostro laboratorio ha identificato il polimorfismo sono eterogenei e differenti da quelli precedentemente elencati in letteratura. Pertanto si è deciso di procedere all'espressione eterologa di CAV3-T78M insieme al canale HCN4, di cui è nota l'interazione con caveolina-3 per valutare eventuali alterazioni delle proprietà biofisiche del canale. Il canale HCN4 è stato quindi espresso insieme alla caveolina-3 *wild type* e T78M, le correnti generate nei due casi sono state registrate mediante esperimenti di *patch clamp* in configurazione *whole-cell*.



**Figura 4:** A. Curve di attivazione relative ai canali hHCN4. I pallini in nero indicano i dati ottenuti dall'analisi dei canali coespressi con hCAV3 *wild type*, i pallini in rosso indicano i dati ottenuti dall'analisi dei canali coespressi con hCAV3 con la mutazione T78M. B. Tracce di corrente registrate a -45 mV, -85 mV, -115 mV nel *wild type* (sopra) e nel mutante T78M (sotto).

I potenziali di mezza attivazione ( $V_{1/2}$ ) (Fig. 4), calcolati utilizzando l'equazione di Boltzmann, risultano essere:

- per CAV3 WT =  $-84.2 \pm 3.7$  mV (n=10)
- per CAV3 T78M =  $-78.3 \pm 2.4$  mV (n=11)

Effettivamente il  $V_{1/2}$  differisce di circa 6 mV, tuttavia i risultati ottenuti non sono statisticamente significativi.

I valori di densità di corrente sono di  $-32.0 \pm 10.3$  pA/pF per il canale che interagisce con CAV3 WT e di  $-46.8 \pm 13.7$  pA/pF per il canale che interagisce con CAV3 T78M.

Anche in questo caso i risultati non hanno raggiunto significatività statistica.

# DISCUSSIONE

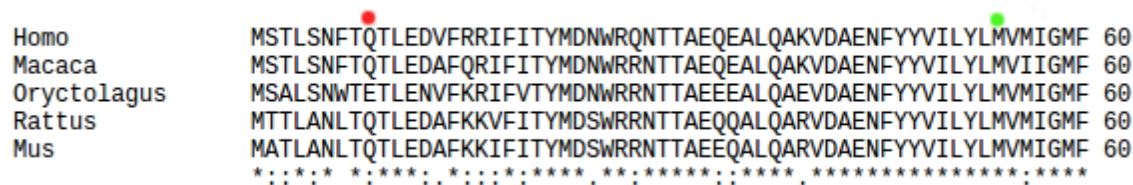
E' noto che le proteine HCN, correlati molecolari della corrente *I<sub>f</sub>* nel cuore ed *I<sub>h</sub>* nei neuroni, interagiscono con un sistema di proteine dotate di attività regolatoria e di ancoraggio alla struttura citoscheletrica. Tra queste proteine quelle che ad oggi sono state meglio studiate sono: la caveolina 3, che influenza la funzionalità di HCN4, la filamina A che collega HCN1 al citoscheletro e MiRP1 che è coinvolto nella modulazione delle ampiezze di corrente e nelle cinetiche di attivazione di HCN2 e 4.

Esperimenti *in vitro* hanno accertato che l'alterata funzionalità di queste proteine può avere profonde ripercussioni funzionali sull'attività e sulle proprietà delle diserve isoforme dei canali HCN. (Gravante *et Al.*, 2004; Barbuti *et Al.*, 2004; Decher *et Al.*, 2003; Qu *et Al.*, 2004). Su questa base abbiamo pertanto deciso di verificare se mutazioni nella sequenza primaria di tali proteine possano essere individuate e quindi accomunare pazienti affetti da vari disturbi del ritmo cardiaco ed epilessia. I pazienti considerati sono: 38 tachicardici (TSI), 107 effetti da bradicardia sinusale (BRA), 21 colpiti da sindrome della morte improvvisa (SUDS), 37 morti prenatali (SADS), 4 colpiti da morte improvvisa infantile, 19 affetti da fibrillazione atriale parossistica (FAP) e 110 epilettici (EPI). Se l'analisi della filamina A (FLNA), negli stessi pazienti, non ha rivelato anomalie genetiche di rilievo, risultati interessanti sono emersi dallo studio di MiRP1 e caveolina 3 (CAV3).

Le mutazioni sono state ricercate attraverso le tecniche di analisi SSCP, DHPLC e di sequenziamento genico, l'analisi statistica è stata effettuata tramite il Test esatto di Fisher.

Per quanto riguarda MiRP1, abbiamo ritrovato i polimorfismi Q9E in un caso di SUD e M54T in un epilettico; queste mutazioni non compaiono nel gruppo controllo composto da 230 soggetti. Abbiamo ritrovato inoltre due polimorfismi, T8A e I57T che sebbene in letteratura, insieme a Q9E e M54T siano stati correlati a fibrillazione atriale farmacoindotta (Sesti *et Al.*, 2000), nel nostro caso, compaiono anche nel gruppo di controllo, rispettivamente 2 e 3 volte. Se da un lato l'indagine meramente statistica non ci conforta per nessun polimorfismo in *Mirp1*, resta notevole il fatto che si abbia 1 caso su 21 per ciò che riguarda Q9E nei SUDS e 1 caso su 110 per M54T negli epilettici, a fronte di nessuno nel gruppo di controllo. E' altresì vero che almeno per i SUDS, il campione resta esiguo e meriterebbe un ampliamento. In generale, tuttavia, resta degno di nota il fatto che entrambe le mutazioni Q9E ed M54T non siano state ritrovate nel gruppo controllo, né in letteratura siano riportate come frequenti nella popolazione sana, diversamente da T8A (Sesti *et Al.*, 2000). Molto poco chiara ed esaustiva è invece la letteratura relativa a I57T che a differenza nostra, non la riporta come frequente nella popolazione sana. In definitiva, focalizzandoci su Q9E ed M54T da punto di vista molecolare possiamo fare un'ulteriore osseverazione: i

due aminoacidi in questione, il Q9 ed l' M54 sono molto conservati anche in altre specie di mammifero, questo porta a ritenere che entrambe le posizioni siano molto rigide in termine di variabilità quindi importanza strutturale e funzionale.



**Figura 1:** allineamento dei primi 60 residui di MiRP1 in alcune specie di mammiferi: *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*. I pallini colorati indicano le colonne di allineamento rispettivamente per Q9E (rosso), M54T (verde). Allineamento ottenuto con Clustalw aligner; dal sito: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>

Nel caso di Q9E il gruppo carbossamide polare della glutammina (Q) viene sostituito con un gruppo acido carbossilico che pertanto modifica qualitativamente le caratteristiche del residuo a causa dell'introduzione di una carica negativa. In M54T una metionina (M), aminoacido solforato apolare invece viene sostituito da una treonina (T) che invece ha caratteristiche polari a causa dell'ossidrile presente nel residuo. Entrambe le variazioni sono contenute nel segmento transmembrana putativo, sede certamente degna di nota, data l'importanza che generalmente i segmenti transmembrana rivestono nella stabilizzazione delle proteine. Non è da escludere quindi che tali variazioni possano alterare in qualche modo la fisiologia sia delle correnti condotte dai canali HCN, come anche altre correnti ioniche, quali quelle del potassio mediate da HERG di cui Mirp1 è subunità regolatoria (Abbott *et Al.*, 1999). Tali alterazioni possono essere responsabili se non direttamente del fenotipo osservato, della predisposizione ad esso in questi particolari pazienti. Per far luce su questo fenomeno sarà necessario procedere ad una caratterizzazione funzionale dei mutanti Q9E ed M54T coesprimendoli in opportuni sistemi eterologhi con le varie isoforme dei canali HCN. Un discorso più complesso merita invece la CAV3, gene in cui sono stati evidenziati oltre che alcuni polimorfismi sinonimi, che non conducono a cambiamenti nella sequenza aminoacidica: L9L, N33N, F41F, V57V e S68S, un polimorfismo non conservativo: T78M. Sebbene tutti i polimorfismi sinonimi e non, siano già stati riportati nel database dell'NCBI e la mutazione T78M sia stata scoperta e studiata in precedenza da Vatta e colleghi in relazione ad alcuni casi di SIDS (Vatta *et Al.*, 2006), il dato estremamente interessante di per sé, è il nostro ritrovamento della stessa in categorie di pazienti completamente nuove.

Infatti l'abbiamo ritrovata in 4 pazienti affetti da tachicardia sinusale (TSI), 2 da fibrillazione atriale parossistica (FAP), 1 bradicardico (BRA), 2 decessi prenatali SADS e 4 epilettici (EPI). T78M non è stata ritrovata in 418 alleli controllo, dato tra l'altro in accordo con la bibliografia relativa (Traverso *et Al.*,

2008; Vatta *et Al.*, 2006). Caratteristica di questo polimorfismo è la sostituzione di una treonina, (T) aminoacido polare, con una metionina (M) aminoacido solforato apolare, nella posizione 78, putativamente appartenente al segmento intramembrana. Storicamente T78M è legata ad alcuni pazienti affetti da LQTS di tipo 9 (una nuova classificazione dovuta alla scoperta di alterazioni in caveolina-3) in bambini deceduti di morte improvvisa (Cronk *et Al.*, 2007). I gruppi di ricerca che hanno precedentemente studiato T78M hanno messo in evidenza la sua capacità di alterare il fisiologico comportamento del canale di sodio SCN5A, il quale in questo caso permette ad una piccola frazione di INa di continuare a fluire nonostante la caratteristica, rapida inattivazione del canale. Questa corrente di sodio tardiva ha permesso a Vatta e colleghi di spiegare il fenotipo patologico dei soggetti recanti il polimorfismo. L'alta incidenza del polimorfismo in alcune popolazioni di malati e la contemporanea assenza nel gruppo di controllo ci induce a sospettare che la presenza di T78M sia un fattore in qualche modo correlabile alle patologie in cui è presente, fermo restando che soprattutto per le categorie TSI e FAP il campione esaminato deve essere esteso. Per quanto riguarda l'identificazione di T78M nei due casi di sindrome di morte improvvisa prenatale (SADS) è possibile trovare una spiegazione in coerenza con la letteratura che associa il polimorfismo a casi di LQTS di tipo 9 e morte improvvisa infantile, in quanto l'allungamento del tratto QT può essere responsabile della morte dei feti (Cronk *et Al.*, 2007). Nuovo e notevole è il riscontro di T78M in soggetti affetti da fibrillazione atriale, tachicardia e epilessia. Si noti che mentre la presenza di CAV3 a livello cardiaco è ben nota e ampiamente studiata, a livello celebrale poche anche se interessanti pubblicazioni la prendono in considerazione (Boulware *et Al.*, 2007). Questa ipotesi è sostenuta anche dal punto di vista statistico infatti il dato è significativo negli individui affetti da tachicardia sinusale inappropriata, fibrillazione atriale parossistica, nei feti deceduti per morte improvvisa come pure negli epilettici. Se i polimorfismi sinonimi ritrovati non sono funzionalmente rilevanti nella determinazione delle patologie, come dichiarato negli stessi database dell'NCBI, un discorso ben diverso è valido per T78M il cui ruolo patologico potrà essere nuovamente e più estesamente dibattuto. Pertanto si è scelto di indagare la capacità di T78M di portare alterazioni funzionali nel canale HCN4. Tenendo conto dei risultati statistici e del ruolo non completamente definito di T78M, abbiamo deciso di studiare le proprietà funzionali di HCN4 espresso insieme al mutante CAV3-T78M, esperimento in prima battuta, particolarmente indicato per la valutazione di eventuali effetti sul ritmo cardiaco. Per questo è stato prodotto un vettore contenente la mutazione di interesse, successivamente trasfettato in cellule HEK 293 per effettuare analisi elettrofisiologiche. La linea cellulare HEK 293 è fisiologicamente priva di caveolae e CAV3. I dati finora raccolti indicano la tendenza di HCN4 che interagisce con CAV3-T78M, ad attivarsi a potenziali più positivi rispetto al *wild type* (circa 6 mV di differenza). Tuttavia l'assenza di significatività statistica, al momento, non permette di trarre conclusioni definitive. Inoltre le cellule che esprimono il canale con CAV3-T78M hanno un valore di



densità di corrente tendenzialmente maggiore rispetto alle cellule che esprimono la forma *wild type* di CAV3. Tuttavia anche per quanto riguarda la densità di corrente non si è raggiunta significatività statistica, pertanto anche in questo caso non si possono trarre conclusioni definitive. Una possibile spiegazione può essere individuata nell'alta variabilità delle singole cellule, che potrà essere superata solo aumentando il numero di misurazioni. Sebbene i dati finora raccolti non siano statisticamente significativi, essi suggeriscono un incremento della corrente *I<sub>f</sub>* e questo è compatibile con le patologie nelle quali il polimorfismo T78M è stato riscontrato con sufficiente significatività statistica. Si è deciso di prendere in esame anche i soggetti affetti da epilessia idiopatica generalizzata in seguito all'identificazione di CAV3 in neuroni ippocampali (Boulware *et Al.*, 2007). In questa popolazione di malati è stato riscontrato il polimorfismo con significativa associazione statistica. Anche in questo caso c'è quindi coerenza tra un aumento di corrente *I<sub>f</sub>* e la patologia, anche se per ora non sono stati effettuati studi di coespressione con canali HCN più rappresentativi a livello neurale, quali l'isoforma 1 e 2.

In definitiva è interessante notare l'eterogeneità dei fenotipi coinvolti, questo è comprensibile se si considera che la CAV3 essendo una proteina con funzione di *scaffold* interagisce con un elevato numero di altre proteine per formare e sostenere dei network di ancoraggio e trasduzione di segnali. E' quindi ipotizzabile che il ruolo di T78M nello sviluppo di patologie si espliciti nell'alterata interazione con una o più proteine del network che possiedono il dominio di interazione per le caveoline, siano esse canali, chinasi, recettori o proteine con funzione strutturale. Non è altresì escludibile che polimorfismi ancora sconosciuti nelle proteine interagenti con CAV3-T78M possano rappresentare un'ulteriore elemento di indirizzo verso un fenotipo patologico piuttosto che un'altro. Oggi una nuova visione della genetica sta affiorando, non è più soddisfacente considerare solo i nessi monogenici alle malattie, bensì frazioni sempre più estese di genoma ove trovare e mettere in associazione veri e propri pattern di polimorfismi. La crescente interdisciplinarietà soprattutto con le scienze cliniche e farmacologiche ci mette a disposizione oltre che una migliore comprensione delle alterazioni genetiche, la possibilità di intervenire su di esse con strategie mirate terapeutiche e preventive. Col progredire delle tecniche diventa sempre più attuale l'analisi di questi marcatori genetici nei casi di patologie ereditarie, e un polimorfismo che oggi può apparire di difficile inquadramento clinico potrà essere valutato nel complesso di più delineate ed estese circostanze genetiche, proprie di ciascuna classe di pazienti. In questo senso la continua espansione della genomica funzionale, della bioinformatica, ed anche dell'epigenetica sviluppatasi in seguito al completamento della mappatura del genoma umano, ambisce al superamento di questa sorta di "miopia" che non consente di valutare un polimorfismo al di fuori del gene a cui si associa, quindi al complesso del codice genetico. I dati di laboratorio che ora si accumulano con insufficiente chiarezza, come nel caso dei polimorfismi riscontrati in MiRP1 e CAV3, diverranno terreno fertile per analisi bioinformatiche complesse quali il *genome wide project*. Metodologia che trova, per mezzo di innovativi approcci

statistici, un nuovo modo di confrontare e organizzare in strutture coerenti polimorfismi fino ad oggi considerati isolati soltanto perchè localizzati in *loci* apparentemente non correlati. Sono già cominciate ad affiorare interazioni tra geni genomicamente distanti ma comuni a varie patologie quali diabete, cancro alla prostata, obesità ed anche malattie cardiovascolari e disturbi del ritmo cardiaco (Holm *et Al.*, 2011; Helgadottir *et Al.*, 2008; Willer *et Al.*, 2008). Lanciamo quindi nel futuro prossimo la sfida alla comprensione delle profonde relazioni che intercorrono tra i geni, le patologie e il benessere umano, affascinati dall'eterna misteriosa meraviglia che guida tutti i ricercatori, l'architettura della Natura.

# BIBLIOGRAFIA

**Altomare C., Bucchi A., Camatini E., Baruscotti M., Viscomi C., Moroni A., DiFrancesco D. (2001).**  
Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J. Gen. Physiol.* 117: 519-532

**Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., DiFrancesco, D. (2003)**  
Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *Journal of Physiology*; 549, 347-359.

**Angelo K., Thomas Jespersen, Morten Grunnet, Morten Schak Nielsen, Dan A Klaerke, and Søren-Peter Olesen ( 2006).**  
KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current"  
*Biophys J* 2002 October; 83(4): 1997

**Antzelevitch C. (2006)**  
Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 29:1130-1159

**Arinsburg SS, Cohen IS, Yu HG. (2006).**  
Constitutively active Src tyrosine kinase changes gating of HCN4 channels through direct binding to the channel proteins. *J Cardiovasc Pharmacol* 47: 578–586.

**Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, DiFrancesco D. (2007).**  
Localization of f-channels caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* Jan;42(1):71-8.

**Barbuti, Biagio Gravante, Monica Riolfo, Raffaella Milanesi, Benedetta Terragni and Dario DiFrancesco. (2004)**  
Localization of Pacemaker Channels in Lipid Rafts Regulates Channel Kinetics". *Circ. Res.* 2004;94;1325-1331;

**Barchi R.L (1995).**  
Molecular pathology of the skeletal muscle sodium channel. *Ann. Rev. Physiol.* 57: 355-385.

- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996).**  
K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80
- Baruscotti M., Georgia Bottelli ., Raffaella Milanese ., Jacopo C., DiFrancesco Dario (2010).**  
HCN-related channelopathies. *Eur J Physiol*
- Bauernfiend R.A., Amat-y-Leon F., Dhingra R.C., Kehoe R., Wyndham C., Rosen K.M. (1979)**  
Chronic nonparoxysmal sinus tachycardia in otherwise healthy persons. *Ann Intern Med* 91:702e10
- Bertrand, D., Picard, F., Le Hellard, S., Weiland, S., Favre, I., Phillips, H., Bertrand, S., Berkovic, S.F., Malafosse, A., Mulley, J., (2002).**  
How mutations in the nAChRs can cause ADNFLE epilepsy. *Epilepsia* 43 (Suppl. 5), 112–122.
- Betz RC, Schoser BG, Kasper D, Ricker K, Ramírez A, Stein V, Torbergesen T, Lee YA, Nöthen MM, Wienker TF, Malin JP, Propping P, Reis A, Mortier W, Jentsch TJ, Vorgerd M, Kubisch C. (2001)**  
Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet.* Jul;28(3):218-9.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. (2009)**  
Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function *Physiol Rev.* Jul 89:(3) 847-885.
- Bonilla E, Fishbeck K, Schotland D. (1981)**  
Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 1981 Aug;104(2):167-73.
- Boulware MI, Kordasiewicz H, Mermelstein PG. (2007)**  
Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons. *J Neurosci.* 2007 Sep 12;27(37):9941-50.
- Bretscher MS, Whytock S. (1977 )**  
Membrane-associated vesicles in fibroblasts. *J Ultrastruct Res.* Nov;61(2):215-7.
- Berkovic, S.F., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Petrou, S., (2006).**  
Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci.* 29, 391–397.

**Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., (1998).**

A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403–406.

**Boulware Marissa I, Holly Kordasiewicz, and Paul G. Mermelstein The Journal of Neuroscience,12 September (2007)**

Caveolin Proteins Are Essential for Distinct Effects of Membrane Estrogen Receptors in Neurons,27(37):9941-9950;doi:10.1523/JEUROSCI.1647-07.

**Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ.(2002)**

Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform-and cell-specific manner. *J Neurosci* 22: 4591–4599.

**Brown, D.A., (1988).**

M currents. *Ion Channels* 1, 55±94.

**Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R. Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R. (1997)**

Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N Engl J Med*;336: 905-911.

**Budde T, Caputi L, Kanyshkova T, Staak R, Abrahamczik C, Munsch T, Pape HC. (2005)**

Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *J Neurosci* 25: 9871–9882.

**Carbone I, Bruno C, Sotgia F, Bado M, Broda P, Masetti E, Panella A, Zara F, Bricarelli FD, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C. (2000)**

Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* Mar 28;54(6):1373-6.

**Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G., 2005.**

International Union of Pharmacology.Nomenclature and structure–function relationships of voltagegated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 397–409.

**Chamary J.V., Parmley J.L., Hurst L.D. (2006)**

Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* 7:98-108

**Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I. (2001)**

Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* 7: 331–337, 2001.

Genetic mechanism that underlie epilepsy. *Nature Genetic Rev.* 5, 400-408.

**Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. (2001).**

Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol*; 117: 491-504.

**Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. Chen Y, Xu S, Bendahhou S, Wong X, Wong Y, Xu W, Sur H, Su X, Zhuang Q, Yang Y, Li Y, Liu Y, Xu H, Ma N, Mou C, Chen Z, Borhonin J, Hong W. (2003)**

KCNQ1 Gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science*;299: 251-254.

**Christopher A. Reid, Samuel F. Berkovic , Steven Petrou. (2009)**

Progress in Neurobiology Mechanisms of human inherited epilepsies. *Progress in Neurobiology* 87,41–57  
Barchi R.L (1995). Molecular pathology of the skeletal muscle sodium channel. *Ann. Rev. Physiol.* 57: 355-385.

**Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. (2004)**

Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1341-79.

**Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. (1997)**

Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6525-33.

**Craven KB, Zagotta WN. (2006)**

CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol* 68: 375–401.

**Cronk LB, Ye B, Kaku T, Tester DJ, Vatta M, Makielski JC, Ackerman MJ. (2007)**

Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm.* 2007 Feb;4(2):161-6.

**Decher N, Bundis F, Vajna R, Steinmeyer K. Biochim Biophys Acta. (2003)**

KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. ; 1446:419 – 425.

**Denyer JC, Brown HF. (1990)**

Rabbit sino-atrial node cells: isolation and electrophysiological properties. *J Physiol.* 1990 Sep;428:405-24

**Demontis, A. Moroni, B. Gravante, C. Altomare, B. Longoni, L. Cervetto, and D. DiFrancesco.(2002).**

Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol*, 542(Pt 1):89

**Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. (1995)**

Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues: palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem.* Mar 24;270(12):6838-42.

**DiFrancesco D. (1981)**

New interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol.* 1981 May;314:359–76.

**DiFrancesco D. (1982).**

Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J Physiol* 329: 485–507.

**DiFrancesco D. (1986)**

Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature.* 1986 Dec 4-10;324:470–473.

**DiFrancesco D, Tortora P. (1991)**

Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145–147.

**DiFrancesco D, Mangoni M. (1994)**

Modulation of single hyperpolarization-activated channels  $i(f)$  by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 474: 473–482, 1994.

**DiFrancesco, Andrea Barbuti, Raffaella Milanesi Stefania Coco, Annalisa Bucci, Carlo Ferrarese, Silvana Franceschetti Benedetta Terragni Mirko Baruscotti Dario DiFrancesco. (2011).**

Recessive Loss-of-Function Mutation in the Pacemaker HCN2 Channel Causing Increased Neuronal Excitability in a Patient with Idiopathic Generalized Epilepsy Jacopo C. *The Journal of Neuroscience.*

**DiFrancesco D, Borer JS. (2007)**

The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs.* 2007. 67 Suppl 2:15-24.2007

**DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. (1986)**

Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 1986 Aug;377:61-88.

**Duggal, P., Vesely, M.R., Wattanasirichaigoon, D., Villafane, J., Kaushik, V., and Beggs, A. H. (1998).** Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 97, 142-146

**Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K.. (1993)**

Caveolae and sorting of the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* 1993 Apr;12(4):1597-605.

**Eksioglu, Y. Z.et al. (1996).**

Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* 16, 77-87

**Engel J, Jr. (2006)**

ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res* 70 Suppl 1:S5-10

**Fan JY, Carpentier JL, van Obberghen E, Grunfeld C, Gorden P, Orci L.(1983)**

Morphological changes of the 3T3-L1 fibroblast plasma membrane upon differentiation to the adipocyte form. *J Cell Sci.* 1983 May;61:219-30.

**Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. (1996)**

Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22810-4.

**Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. (1998)**

Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30249-54.

**Fisch C. (1984)**

Bundle branch block after ventricular tachycardia: A manifestation of "fatigue" or "overdrive suppression". *J Am Coll Cardiol.* 1984; 3; 1562-4.

**Forbes MS, Rennels ML, Nelson E. (1979)**

Caveolar systems and sarcoplasmic reticulum in coronary smooth muscle cells of the mouse. *J Ultrastruct Res.* 1979 Jun;67(3):325-39.



**Fra AM, Pasqualetto E, Mancini M, Sitia R. (2002)**

Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin-1 and caveolin-2 Gene. 2000 Feb 8;243(1-2):75-83.

**Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. (2000)**

Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. J Cell Sci. 2000 Oct;113 Pt 19:3509-17.

**Fusco, M. D. et al. (2000)**

The nicotinic receptor  $\beta 2$  subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. Nature Genet. 26, 275–276

**Ghitescu L, Fixman A, Simonescu M, and Simonescu N. (1986)**

Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. J Cell Biol. 1986 Apr;102(4):1304-11.

**Glenney JR Jr, Zokas L. (1989)**

Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. J Cell Biol. 1989 Jun;108(6):2401-8.

**Glenney JR. (1992)**

The sequence of human caveolin reveals identity with VIP 21, a component of transport vesicles. FEBS Lett. 1992 Dec 7;314(1):45-8.

**Gorlin, J. B. et al. (1990).**

Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. J. Cell Biol. 111, 1089–1105

**Gravante Biagio, Andrea Barbuti, Raffaella Milanesi, Ivan Zappi, Carlo Viscomi, and Dario DiFrancesco. (2004)**

Interaction of the Pacemaker Channel HCN1 with Filamin A". The journal of biological chemistry Vol. 279, No. 42, Issue of October 15, pp. 43847–43853,

**Hans M, Luvisetto S, Williams M, Spagnolo M, Urrutia A, Stauderman K, Pietrobon D (1999).**

Functional consequences of mutations in the human  $\alpha 1A$  calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine.. J Neurosci 19 (5): 1610–9. PMID 10024348.

**Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. (2001)**

Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. J. Biol. Chem. 250, 5696–5705 (1975)

Stossel, T. P. et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2, 138–145

**Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Hamaguchi M. (2001)**

Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2361-4.

**Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A. (2004)**

Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 2;313(1):178-84.

**Helgadottir A., Thorleifsson G., Magnusson K.P (2008).**

The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. Nature Genetics 2008 40(2):217-224

**Herrmann R, Straub V, Blank M, Kutzick C, Franke N, Jacob EN, Voit T.(2000)**

Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2000 Sep 22;9(15):2335-40.

**Hille, B. Ionic Channels of Excitable (1992)**

Membranes 2nd ed. (Sinauer,Massachusetts)

**Hoda, J.C., Gu, W., Friedli, M., Phillips, H., Bertrand, S., Antonarakis, S.E., Goudie, D.,**

**Roberts, R., , J., Berkovic, S.F., Mulley, J.C., Steinlein, O.K., Bertrand, D.C., (2008).**

Human nocturnal frontal lobe epilepsy: pharmacogenomic profiles of pathogenic nAChR {beta}-subunit mutations outside the ion channel pore. Mol. Pharmacol.

**Holm H., F Gudbjardtoson, P Sulem, G Massom, Th Hafdis (2001).**

A rare variant in MYH6 is associated with higher risk of sick sinus syndrome." Nature Genetics 43(4) 316-320 11 march.

**Hutcheon B, Yarom Y. (2000)**

Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* 23: 216–222.

**Huttenlocher, P. R., Taravath, S. & Mojtahedi, S. (1994).**

Periventricular heterotopia and epilepsy. *Neurology* 44, 51–55

**Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. (1999)**

Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem.* 1999 Apr 30;274(18):12835-9.

**Ishii, M.T., Takano, M., Ohmori, H. (2001)**

Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *Journal of Physiology*; 537, 93-100.

**Jackson H.A., Marshall C.R., and Accili E.A. (2007)**

Evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel genes. *Physiol Genomics* 29: 231–245

**Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. (2003)**

X-ray structure of a voltage-dependent K channel. *Nature* 423: 33–41

**Jihong Qu Yelena Kryukova Irina A. Potapova Sergey V. Doronin Michael Larsen Ganga Krishnamurthy Ira S. Cohen and Richard B. Robinson October 15, (2004).**

MiRP1 Modulates HCN2 Channel Expression and Gating in Cardiac Myocytes *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 43497-43502.

**Kandel R.E, Schwartz J.H, Jessell T.M. (2003)**

Principi di neuroscienze. Terza edizione italiana.

**Kaupp U.B., Seifert R. (2001)**

Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* 63:235-57

**Kaupp UB, Seifert R. (2002)**

Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82: 769–824.

**Kaczmarek, L.K., and Blumenthal, E.M. (1997)**

Properties and regulation of the MinK potassium channel protein. *Physiol. Rev.* 77, 627-641

**Kandel R.E, Schwartz J.H, Jessell T.M (2003)**

Principi di neuroscienze. Terza edizione italiana.

**Krahn A.D., Yee R., Klein G.J., Morillo C. (1995)**

Inappropriate sinus tachycardia: evaluation and therapy. J Cardiovasc Electrophysiol 6:1124;1128

**Kryukova Irina A. Potapova Sergey V. Doronin Michael Larsen Ganga Krishnamurthy Ira S. Cohen and Richard B. Robinson, (2004)**

MiRP1 Modulates HCN2 Channel Expression and Gating in Cardiac Myocytes Jihong Qu Yelena The Journal of Biological Chemistry, 279, 43497-43502.

**Kuisle M, Wanaverbecq N, Brewster AL, Frere SG, Pinault D, Baram TZ, Luthi A.(2006)**

Functional stabilization of weakened thalamic pacemaker channel regulation in rat absence epilepsy. J Physiol 575: 83–100.

**Kullmann, D. M. & Hanna, M. G. (2002)**

Neurological disorders caused by inherited ion channel mutations. Lancet. 1, 157–166.

**Lahtinen U, Honsho M, Parton RG, Simons K, Verkade P. (2003)**

Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. FEBS Lett. 2003 Mar 13;538(1-3):85-8.

**Langendorf R, Pick A. (1971)**

Artificial pacing of the human heart: Its contribution to understanding of the arrhythmias. Am J Cardiol. 1971; 28: 516-25.

**Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG, Lisanti MP. (2002)**

Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. Am J Pathol. 2002 Oct;161(4):1357-69.

**Lee, K.L., Jim, M.H., Tang, S.C., and Tai, Y.T. (1998).**

QT prolongation and Torsades de Pointes associated with clarithromycin. Am. J. Med. 104, 395- 396

**Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB, Wilson MT, Campos-Gonzalez R, Bouzahzah B, Pestell RG, Scherer PE, Lisanti MP. (2000)**

Constitutive and growth factor regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol*. 2000 Nov;14(11):1750-75.

**Lee H, Woodman SE, Engelman JA, Volonté D, Galbiati F, Kaufman HL, Lublin DM, Lisanti MP (2001).**

Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):35150-8.

**Lesage, F., Attali, B., Lakey, J., Honore, E., Romey, G., M., and Barhanin, J. (1993).**

Are Xenopus oocytes unique in displaying unctinal IsK channel heterologous expression? *Receptors and Channels* 1, 143-152

**Leanne M. Dibbens, Christopher A. Reid, Bree Hodgson, Evan A. Thomas, Alison M. Phillips, Elena Gazina, Brett A. Cromer, Alison L. Clarke, Tallie Z. Baram, Ingrid E. Scheffer, Samuel F. Berkovic, Steven Petrou.(2010)**

Augmented Currents of an HCN2 Variant in Patients with Febrile Seizure Syndromes. *ANN NEUROL* ;67:000–000

**Lee R.J., Kalman J.M., Scheinman M.M., (1995)**

Radiofrequency catheter modification of the sinus node for ‘inappropriate’ sinus tachycardia. *Circulation* 92:2919

**Lee R.J., Shinbane J.S. (1997)**

Inappropriate sinus tachycardia. Diagnosis and treatment. *Cardiol Clin* 15:599;605

**Li S, Couet J, Lisanti MP. (1996)**

Src tyrosine kinases, G alpha subunits and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, Caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29182-90.

**Li S, Galbiati F, Volonte D, Sargiacomo M, Engelman JA, Das K, Scherer PE, Lisanti MP. (1998)**

Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett*. 1998 Aug 28;434(1-2):127-34.

**Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP. (1995)**

Evidence for a regulated interaction of hetero-trimeric G proteins with caveolin. *J Biol Chem.* 1995 Jun 30;270(26):15693-701.

**Li S, Seitz R, Lisanti MP. (1996)**

Phosphorylation of caveolin by Src tyrosine kinases: the  $\alpha$ -isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem.* 1996 Feb 16;271(7):3863-8.

**Li S, Song KS, Koh SS, Kikuchi A, Lisanti MP. (1996)**

Baculovirus-based expression of mammalian caveolin in Sf21 insect cells. A model system for the biochemical and morphological study of caveolae biogenesis. *J Biol Chem.* 1996 Nov 8;271(45):28647-54.

**Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. (1994)**

Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 1994 Jul;126(1):111-26.

**Lisanti MP, Cordone G. (2002)**

Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):265-70.

**Lossin, C., Wang, D.W., Rhodes, T.H., Vanoye, C.G., George Jr., A.L., (2002)**

Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34, 877–884.

**London B., Michalec M., Mehdi H., (2007)**

Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac  $\text{Na}^+$  current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 116:2260-2268

**Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. (2005)**

Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309: 903–908

**Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. (1998)**

A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature.* 1998 Jun 11;393(6685):587-91.

**Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. (1999)**

Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. EMBO J. 1999 May 4;18(9):2323-9

**Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. (1998) .**

A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. Nature 393: 587–591.

**Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, h A, Pape HC, Biel M, Hofmann F. (2003)**

Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. EMBO J 22: 216–224.

**Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D. (1993)**

Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. J. Neurophysiol. 69:212-236

**Manderfield LJ, Daniels MA, Vanoye CG, George AL Jr. (2009)**

KCNE4 domains required for inhibition of KCNQ1. J Physiol. Jan 15;587(Pt 2):303-14. Epub 2008 Nov 24.

**McCormick DA, Bal T. (1997)**

Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. Annu Rev Neurosci 20: 185–215.

**McCormick DA, Huguenard JR. (1992)**

A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. J Neurophysiol 68: 1384–1400.

**McCormick DA, Pape HC. (1990)**

Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. J. Physiol. 431:291-318.

**McCormick DA, Pape HC.(1990)**

Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. J Physiol 431: 319–342.

**McHugh JC, Delanty N (2008)**

Epidemiology and classification of epilepsy: gender comparisons. *Int Rev Neurobiol* 83:11-26

**Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. (2007)**

Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome. *Rev Esp Cardio* 60: 739-752.

**Merlini L, Carbone I, Capanni C, Sabatelli P, Tortorelli S, Sotgia F, Lisanti MP, Minetti C. (2002)**

Familial isolated hyperCKaemia associated with a new mutation in the caveolin-3 (CAV-3) gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Jul;73(1):65-7.

**Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscone T, DiFrancesco D. (2006)**

Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354(2):151-7.

**Minetti C, Sotgia F, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F. (1998)**

Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998 Apr;18(4):365-8.

**Mistrik P, Mader R, Michalakakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. (2005)**

The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 280: 27056–27061.

**Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV. (1996)**

Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett*. 1996 Jun 17;388(2-3):143-9.

**Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia T. (1995)**

VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*. 1995 Jul;6(7):911-27.



**Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D. (2001)**

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J Biol Chem.* 2001 Aug 3;276(31):29233-41.

**Moro, F.et Al. (2002)**

Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology*58, 916–921 .

**Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D.(2001)**

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J Biol Chem.*; 276: 29233-29241

**Moroni A., Barbuti A., Altomare C., Viscomi C., Morgan J., Baruscotti M., DiFrancesco D. (2000)**

Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflugers Arch.* 439: 618-626

**Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A.(1999)**

Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380: 975–980.

**Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A.(2001)**

Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization- activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268: 1646–1652.

**Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. (1996)**

Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol.* 1996 Jun 15;493:801–18.

**Nackley A.G., Shabalina S.A., Tchivileva . (2006)**

Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 314:1930-1933

**Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, et al., (2005)**

Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294:2975-80.

**Notomi T, Shigemoto R. (2004)**

Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471: 241–276.

**Ophoff R, Terwindt G, Vergouwe M, Hoffman S, Lamerdin J, Hofker M, Ferrari M, Frants R (1996).**

Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4.. *Cell* 87 (3): 543–52.

**Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989)**

Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8):2766-2770

**Orlandi PA, Fishman PH. (1998)**

Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* 1998 May 18;141(4):905-15.

**Pape HC. (1994)**

Specific bradycardic agents block the hyperpolarizationactivated cation current in central neurons. *Neuroscience* 59: 363–373.

**Pape HC. (1996).**

Queer current and pacemaker: the hyperpolarizationactivated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299–327.

**Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Wang H, Shi W, Robinson R, Wymore R. (2001)**

MinK-related peptide 1: a beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res.* 2001 Jun 22;88(12):E84-7.

**Priori SG, Bloise R, Crotti L. (2001)**

The long QT syndrome. *Europace* 3:16-27.

**Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. (1999)**

Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 99:529-33.

**Priori S.G., Napolitano C., Memmi M., Gasparini M., DeSimone F.E., Vignati G., DeLogu A. (2002)**  
Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*;106:69-74

**Qu, J., Kryukova, Y., Potapova, I. A., Doronin, S. V., Larsen, M., Krishnamurthy, G., Cohen, I. S., Robinson, R. B. (2004)**  
MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 43497-43502

**Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. (2001)**  
Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38121-38.

**Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H Jr, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. (2002)**  
Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol*. 2002 Apr;22(7):2329-44.

**Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. (2002)**  
Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*. 2002 Sep;54(3):431-67.

**Repetto S, Bado M, Broda P, Lucania G, Masetti E, Sotgia F, Carbone I, Pavan A, Bonilla E, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C. (1999)**  
Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 11;261(3):547-50.

**Roberts R. Roberts R. (2006)**  
Mechanisms of Disease: genetic mechanisms of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* ;3: 276-282.

**Robinson RB, Siegelbaum SA. (2003)**  
Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65: 453–480.

**Rojas CV, Wang JZ, Schwartz LS, Hoffman EP, Powell BR, Brown RH., Jr A. (1991)**

Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit in hyperkalaemic periodic paralysis. *Nature*.;354:387–389.

**Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. (1992)**

Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb 21;68(4):673-82.

**Runge M, Narula O. (1973)**

"Fatigue" phenomenon in the human His-Purkinje system. *Circulation*. 1973; 48: IV-103.

**Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. (2000)**

Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem*. 2000 Dec 29;275(52):41447-57.

**Sanguinetti, M.C. and Spector, P.S. (1997)**

Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* 36, 755-762.

**Sanguinetti, M.C. and Jurkiewicz, N.K. (1990)**

Two components of cardiac delayedrectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physio*. 96, 195-215

**Sanguinetti, M.C., Curran M.E., Zou, A., Shen.L., and Keating, M.T. (1996)**

Coassembly of K(V)Lqt1 and Mink (Isk) proteins to form cardiac I-Ks potassium channel. *Nature* 384, 80-83

**Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., and Keating, M.T. (1995)**

A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81, 299-307

**Santoro, S. Chen, A. Luthi, P. Pavlidis, G. P. Shumyatsky, G. R. Tibbs, and S. A. Siegelbaum.(2000)**

Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci*, 20(14):5264-5275.

**Santoro B., Liu D.T., Yao H., et al. (1998)**

Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93:717–729

**Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR. (1998)**

Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*. 1998 May 29;93(5):717-29.

**Sargiacomo M, Scherer PE, Tang ZL, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. (1995)**

Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 Sep 26;92(20):9407-11.

**Schatterern P., Diekhans M. (2006)**

Regions of extreme synonymous codon selection in mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 34: 1700-1710

**Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. (1997)**

Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem*. 1997 Nov 14;272(46):29337-46.

**Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. (1996)**

Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):131-5.

**Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. (1995)**

Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*. 1995 Jul 7;270(27):16395-401.

**Schimpf R., Wolpert C., Gaita F., Giustetto C., Borggrefe M. (2005)**

Short QT syndrome. *Cardiovasc Res* 67(3):357-66

**Schlegel A, Lisanti MP. (2000)**

A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. J Biol Chem 2000 Jul 14;275(28):21605-17.

**Schlegel A, Schwab R, Scherer PE, Lisanti MP. (1999)**

A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. J Biol Chem 1999 Aug 6;274(32):22660-

**Schroeder R, London E, Brown D. (1994)**

Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. Proc Natl Acad Sci USA 1994 Dec 6;91(25):12130-4.

**Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. (1999)**

Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. Proc Natl Acad Sci USA 1999 Aug 3;96(16):9391-6.

**Sesti, F., Abbott, G.W., Wei, J., Murray, K.T., Saksena, S., Schwartz, P. J., Priori, S.G., Roden, D.M., George, A.L.J., and Goldstein, S.A.N. (2000)**

A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10613- 10618

**Sesti, F. and Goldstein, (1998).**

Singlechannel characteristics of wildtype I<sub>Ks</sub> channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. J. Gen. Phys. 112, 651-664

**Sheen, V. L et al. (2002)**

Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. Hum. Mol. Genet. 11, 2845–2854 (2002).

**Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS. (1999)**

Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*. 1999 Jul 9;85(1):e1-6.

**Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS. (1999)**

Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) Mrna expression in cardiac tissues. *Circ Res* 85: e1–6.

**Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D.(2004)**

Seizureinduced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* 44: 495–508.

**Schulze-Bahr E., Neu A., Friederich P., Kaupp B., Breithardt G., Pongs O., Isbrandt (2003)**

Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 111: 1537-1545

**Sgarbossa E.B., Yamanouchi Y., Rejna T.G., Miller D.P., Morant V.A., Pinski S.L. (1995)**

Autonomic imbalance in patients with inappropriate sinus tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 25

**Simionescu N, Simionescu M, and Palade GE. (1983)**

Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides: evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol*.Mar;64(3):586-607.Simionescu N, Simionescu M. *Histology: Cell and Tissue Biology*, ed Weiss L. (Elsevier Biomedical, New York), Fifth Ed. 1983. pp 371–433.

**Smith, P.L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996).**

The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379, 833-836

**Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C,Kohtz DS, Lisanti MP. (1996)**

Expression of caveolin-3 in skeletal,cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21;271(25):15160-5.

**Song KS, Tang ZL, Li S, Lisanti MP. (1997)**

Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homotypic caveolin-caveolin interactions. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4398-403.

**Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Sargiacomo M, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP. (2000)**

Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of betadystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1;275(48):38048-58.

**Steinberg SF. (2004)**

beta(2)-Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Aug;37(2):407-15.

**Steinlein, O K. et Al. (1995)**

A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4$  subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genet.* 11, 201–203.

**Steinlein O.K (2004)**

Genetic mechanism that underlie epilepsy. *Nature Genetic Rev.* 5, 400-408

**Stieber, J., Stockl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., Hofmann, F. (2005)**

Functional expression of the human HCN3 channel. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280, 34635-34643.

**Stossel, T. P. & Hartwig, J. H. (1975)**

Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin  $Mg^{2+}$ -adenosine triphosphatase requires a cofactor for activation by actin. *J. Biol. Chem.* 250, 5706–5712

**Stossel, T. P. et al. (2001)**

Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 138–145

**Strauss U, Kole MH, Brauer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA. (2004)**

An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19: 3048–3058.



**Swanson, R., Hice, R.E., Folander, K., and Sanguinetti, M.C. (1993).**

The Isk protein, a slowly activating voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Semin. Neurosci.* 5, 117- 124

**Tang B, Thomas Sander, Kimberley B. Craven, Anne Hempelmann, and Andrew Escayg. (2008)**

Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiology of Disease* 29 ; 59–70

**Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, I, Lodish HF, Lisanti MP. (1996)**

Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26;271(4):2255-61.

**Takumi, T., Ohkubo, H. and Nakanishi, S. (1988)**

Cloning of a membrane protein that induces a slow voltagegated potassium current. *Science* 242, 1042-1045

**Thompson, T. G.et Al. (2000)**

Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell Biol.*148, 115–126 (2000)

**Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. (2005)**

Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2:507-17.

**Traverso et Al, (2008)**

Caveolin-3 T78M and T78K missense mutations lead to different phenotypes in vivo and in vitro. Laboratory investigation

**Tyson, J., Tranebjaerg, L., Bellman, S., Wren, C., Taylor, J.F., a, S., and Bitner-Glindzicz, (1997).**

IsK and KvLQT1: Mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2179-218

**Ueda K., Nakamura K., Hayashi T., Inagaki N., Takahashi M., Arimura T., Morita H., Higashiuesato Y., Ohe T., Sunamori M., Hiraoka M., Kimura A. (2004)**

Functional characterization of a Trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac Arrhythmia. *The Journal of biological chemistry* 279:27194-27198

**Uittenbogaard A, Smart EJ. (2000)**

Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25595-9.

**Vaccari, T., Moroni, A., Rocchi, M., Gorza, L., Bianchi, M. E., Beltrame, M., DiFrancesco, D. (1999).**

The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression* 1446, 419-425.

**Van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. BBA- Mol. Cell Res. (2001) Apr 23;1538(2-3):99-117.**

**Vatta Matteo, Michael J. Ackerman, Bin Ye, Jonathan C. Makielski, Enoch E. Ughanze, Erica W. Taylor, David J. Tester, Ravi C. Balijepalli, Jason D. Foell, Zhaohui Li, Timothy J. Kamp, Jeffrey A. Towbin. (2006)**

Mutant Caveolin-3 Induces Persistent Late Sodium Current and Is Associated With Long-QT Syndrome.;114;2104-2112.*Circulation*

**Viscomi C, Altomare C, Bucci A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D. (2001)**

C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem.* 2001 Aug 10;276(32):29930-4.

**Wang, H.S., Pan, Z., Shi, W., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D., (1998).**

KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890–1893.

**Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., et al. (1996).**

Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12, 17-23

**Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. ((2001)**

Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2001 Jun 14;411(6839):805-1

**Willer C.J., Sanna S., Jackson A.U. (2008).**

Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature Genetics* 40(2):161-169

**Weiland S, Bertrand D, Leonard S. (2000).**

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the gene to the disease. *Behav Brain Res*;113:43–56.

**Wu JY, Cohen IS. (1997)**

Tyrosine kinase inhibition reduces *i*(f) in rabbit sinoatrial node myocytes. *Pflugers Arch*. 1997 Sep: 509–514.

**Xue T., Marban E., Li R. A. (2002)**

Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circulation Research*; 90, 1267-1273.

**Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K,D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. (2004)**

Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet*;75: 899-905.

**Yang, Y and Sigworth, F. (1998)**

Single channel properties of IKs potassium channels. *J. Gen. Physio.* 112, 665-678

**Yu H, Chang F, Cohen IS. (1995)**

Pacemaker current *i*(f) in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol*. 1995 Jun 1;485:469-83.

**Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El Maghrabi MR, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R. (2001)**

MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res*. 88: E84-E87

**Yuanyi Feng & Christopher A. Walsh1 (2004)**

The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling  
Nature Cell Biology, 1034 - 1038 (2004) doi:10.1038/ncb1104-1034

**Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E.(2003)**

Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature 425: 200–205.

**Zolles G, Klocker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B. (2006)**

Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. Neuron 52: 1027–1036.