

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Determinantes moleculares de la modulación farmacológica de los canales cardiacos humanos que generan la corriente  $I_{K1}$**

**PRESENTADA POR**

**Pablo Dolz Gaitón**

Directores

Eva Delpón Mosquera  
Ricardo Caballero Collado  
Juan Tamargo Menéndez

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**DETERMINANTES MOLECULARES DE LA MODULACIÓN  
FARMACOLÓGICA DE LOS CANALES CARDIACOS  
HUMANOS QUE GENERAN LA CORRIENTE  $I_{K1}$**

**TESIS DOCTORAL DE**

**D. Pablo Dolz Gaitón**

**DIRECTORES**

**Dra. Eva Delpón Mosquera**

**Dr. Ricardo Caballero Collado**

**Dr. Juan Tamargo Menéndez**

**Madrid, 2014**



*A mis padres y a María.*



## **AGRADECIMIENTOS**



La principal razón de que esta Tesis Doctoral sea una realidad es que tres profesores de la Universidad Complutense de Madrid hace ya unos cuantos años escribieron un excelente proyecto, fruto de su pasión por la farmacología y la electrofisiología. Y gracias a ese proyecto, pudieron ofrecerme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación. Tras cuatro años, puedo decir que jamás había aprendido de nadie tanto en tan poco tiempo. Por todo ello quiero agradecer a mis directores de tesis, los Profs. Eva Delpón, Juan Tamargo y Ricardo Caballero.

Por supuesto, sin el esfuerzo y dedicación de mis compañeros de laboratorio estas páginas no se hubieran llenado de resultados. Se suele decir que el trabajo de investigación es un trabajo en equipo y nunca ha sido tan cierta esta frase. A los ya doctores, Ricardo Gómez, Irene Amorós, Adriana Barana y Marta González, les quiero agradecer todas esas horas metidos en una jaula de Faraday para hacer esta Tesis posible. También quiero agradecer a mis compañeros Marcos Matamoros, Marta Pérez-Hernández y Mercedes Núñez, que recientemente se incorporaron, por su dedicación y compañerismo. A Sandra Sacristán y Paloma Vaquero que saben perfectamente que juegan un papel imprescindible para que el laboratorio funcione fluidamente.

A mi madre, sin ella jamás habría podido comenzar este viaje. Y a mi padre, pues sin él me hubiera quedado a mitad de camino. A los dos, gracias por el cariño y el apoyo incondicional todos estos años. Sois y seguiréis siendo mi ejemplo a seguir. A mi hermana, la otra doctora; los dos hemos finalizado una etapa muy importante de nuestra vida y sin embargo, seguimos igual que siempre.

A mis amigos de la *terreta*, Octavio y Cata, por las interminables tardes al lado del *Chamaerops humilis*. A Iván, incondicional, por haberme introducido en mi otra gran pasión: la música. A Marta y Víctor (ya doctor), por todos esos viajes, hechos y por hacer, que no son más que una excusa para vernos y comer. A mis amigos madrileños, Camilla, Juan, Luna, Fer... Habéis conseguido que me sienta como en casa.

A los Profs. Maria Isabel Colado e Ignacio Lizasoain, actual y anterior Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme acogido amablemente en el Departamento.

A María, pues nunca nadie me dio tanto por tan poco. Si la autoría de un trabajo se midiese en paciencia y sacrificio, sin duda tu nombre debería estar en la portada. Sólo espero poder hacer lo mismo cuando te encuentres en mi lugar dentro de unos meses. Ciertamente, no podría haber escogido mejor compañera de viaje.





## **SUMMARY**



## INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The outward inward rectifying  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) activates during phase 3 of the cardiac action potential (AP). This current shapes the final phase of the AP and therefore controls the AP duration (APD) and cardiac refractoriness.  $I_{K1}$  is also the main responsible of maintaining the membrane potential during phase 4 (i.e., resting potential) in cardiac cells. One of the most distinctive features of the channels that generate  $I_{K1}$  is the “inward rectification”, consisting in a large conductance when  $K^+$  enters the cell at potentials negative to the  $K^+$  reversal potential ( $E_K$ ), but a small one when  $K^+$  exits the cell at potentials positive to the  $E_K$ . Inward rectification is due to the channel block by polyamine and  $Mg^{2+}$  ions. Moreover, phosphatidil-4,5-inophosphate ( $PIP_2$ ) is essential to increase the channel open probability. In human myocardium it has been described the presence of 3 clones that generate  $I_{K1}$ : Kir2.1, 2.2 and 2.3.  $I_{K1}$  density is 6-fold higher in ventricles than in atria, a difference that has been attributed to the non-uniform expression of Kir2.x channels. It has been shown that the main determinant of human  $I_{K1}$  is the Kir2.1 protein. In fact, loss and gain-of-function mutations of the gen that codifies this channel (i.e., *KCNJ2*), produce Andersen-Tawil syndrome and Short-QT syndrome III, respectively.

Fibrillation, such as atrial (AF) or ventricular (VF), is a fast and turbulent cardiac electrical activity that leads to the loss of contractile function in myocardium. Nowadays, both represent a serious healthcare, being AF the most common arrhythmia. It is widely accepted that these arrhythmias generate by the “re-entry” of a cardiac impulse forming rotors. It has been shown that an increase in  $I_{K1}$  amplitude leads to an increase in the rotor frequency and stability. Furthermore, the increase in Kir2.1 channel expression observed in AF has been identified as one the causes of the limited success of conventional AF treatment with class Ic antiarrhythmic drugs (i.e., flecainide and propafenone). It has been proposed that the selective inhibition of atrial  $I_{K1}$  could be a safe and effective alternative for the AF pharmacologic treatment. Nonetheless, nowadays the molecular determinants of the pharmacologic modulation of  $I_{K1}$  human channels remain unknown.

Therefore, the main objectives of this Doctoral Thesis were:

1. To analyse the effects of flecainide on the currents of heterologously expressed human cloned Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3 channels and on human  $I_{K1}$ .
2. To identify the probable binding sites of flecainide into the channels and describe the mechanisms in which this interaction induces the effects described.
3. To analyse the effects of propafenone on the currents of heterologously expressed human cloned Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3 channels and on human  $I_{K1}$ .

4. To identify the probable binding sites of propafenone into the channels and describe the mechanisms in which this interaction induces the effects described.

## METHODS AND RESULTS

We first studied the effects of flecainide on the currents generated by Kir2.1, 2.2 and 2.3 human cardiac channels transiently transfected on Chinese hamster ovary (CHO) cells, by using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique.

Flecainide increased the current amplitude generated by homo-tetramers of Kir2.1 channels ( $I_{Kir2.1}$ ), an effect more marked at physiological potentials. This effect was not present in currents generated by homo-tetrameric Kir2.2 or Kir2.3 channels, nor it was when channels were formed by hetero-tetramers. In both, human and guinea-pig atrial myocytes, no change in  $I_{K1}$  amplitude was observed when perfused with 1  $\mu$ M flecainide. However, in guinea-pig ventricular myocytes, where Kir2.1 channels contribution to  $I_{K1}$  is higher, an increase in  $I_{K1}$  amplitude was observed when perfused with flecainide.

In single-channel patch-clamp experiments, 1  $\mu$ M flecainide increased the open frequency, the open probability and the mean open time significantly, an effect identical to that produced by an increased PIP<sub>2</sub>-channel interaction. Flecainide did not modify the current generated by the low PIP<sub>2</sub>-affinity mutant, Kir2.1L222I, proving that PIP<sub>2</sub> is needed for the flecainide increasing effect.

Inside-out patch-clamp experiments demonstrated that flecainide produced a rightward and downward shift of the concentration-effect curve for the spermine blockade, suggesting that flecainide lowered the channel polyamine affinity by an allosteric modulation. Moreover, flecainide was unable to increase the current generated Kir2.1 channels with mutations that determine the polyamine binding.

To identify the flecainide binding site, a molecular model was built using the protein-crystallized structures of the transmembrane and cytoplasmic domains described by X-ray diffraction. Blind-docking experiments showed that the lowest energy binding site was located at the  $\beta$ I-sheet region of the cytoplasmic domain. Manual docking experiments identified the interaction of flecainide with Cys311. This interaction was corroborated with site-directed mutation experiments.

Flecainide 1  $\mu$ M also increased currents generated by WT and Andersen-Tawil syndrome-related mutated channels upon 24 h incubation.

A high dose of propafenone (50  $\mu$ M) decreases significantly both outward and inward currents generated by homo- and hetero-tetrameric Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3 channels. Furthermore, it abolishes the inward rectification of the channels, and thus, current at potentials positive to  $E_K$  was linear function of the voltage. After analysing the effect of propafenone on human atrial  $I_{K1}$ , we demonstrated that the blockade potency order was Kir2.3= $I_{K1}$ >Kir2.2>Kir2.1. However, propafenone inhibition of the currents generated by mutants Kir2.1L222I (a mutant with low PIP<sub>2</sub> affinity) and Kir2.3I314L (a mutant with high PIP<sub>2</sub> affinity) was no different to that of the WT channels.

The analysis of Kir2.1 unitary currents by single channel patch-clamp showed only two peaks on the amplitude histogram on control conditions, corresponding to the open and closed state, whereas in presence of propafenone, three additional open sub-states were observed.

Inside-out patch-clamp experiments demonstrated that after application of propafenone at the internal side of the membrane, steady-state block was reached with a slow onset block time course, similar to that observed when the drug was perfused extracellularly under whole-cell configuration, suggesting that  $I_{Kir2.1}$  inhibition was not due to Kir2.1 pore block. Moreover, in the presence of propafenone, the time required for the current to decrease by 50% of neomycin-induced rundown was significantly reduced, suggesting that propafenone weakens channel-PIP<sub>2</sub> interaction. In another experiment set, we inhibited the entire current with neomycin, adding after, increasing concentrations of PIP<sub>2</sub> to recover the initial current amplitude. In presence of propafenone, the agonist effect of PIP<sub>2</sub>, was significantly lower, proving that the drug decreases the channel sensitivity to PIP<sub>2</sub>. It has been shown that mutant channels that exhibit low polyamines affinity also exhibit low PIP<sub>2</sub> affinity. Our results demonstrated that in nearly all of these mutants propafenone-induced block was significantly greater than in Kir2.1 WT channels, showing that polyamines could be acting as cofactors with PIP<sub>2</sub>.

Blind docking and site-directed mutagenesis experiments demonstrated that propafenone bound Kir2.x channels at the cytoplasmic domain, close to, but not in the pore itself, the binding site involving two conserved Arg residues (residues 228 and 260 in Kir2.1). Our results suggested that propafenone incorporated into the cytoplasmic domain of the channel in such a way that it decreased the net negative charge sensed by K<sup>+</sup> ions and polyamines which, in turn, promotes the appearance of subconductance levels and the decrease of PIP<sub>2</sub> affinity of the channels.

## CONCLUSIONS

In this Doctoral Thesis we have demonstrated that flecainide increases  $I_{Kir2.1}$  with two simultaneous mechanisms: a) by stimulating PIP<sub>2</sub> interaction with the channel and b) by decreasing the polyamine affinity of the channel, decreasing also the inward rectification. These effects are achieved allosterically as a consequence of the drug binding to Cys311, located in the cytoplasmic domain of Kir2.1 channels that is not present in Kir2.2 or Kir2.3, which justifies the effect selectivity

Besides, propafenone inhibits the current generated by all three human cardiac Kir2 isoforms by a novel mechanism and, to our knowledge, never described before for any other drug. This mechanism consists in the allosteric binding of propafenone to the cytoplasmic domain, decreasing the total negative charge that K<sup>+</sup> ions and polyamines perceive, which in turn, promotes the appearance of open channel sub-states and a decrease the channel affinity to PIP<sub>2</sub>.

## **RESUMEN**





## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La corriente de salida de  $K^+$  con rectificación interna ( $I_{K1}$ ) es una corriente que se activa durante la fase 3 del potencial de acción (PA) generado en células cardiacas. Esta corriente determina la fase final de la repolarización y participa, por tanto, en el control de la duración de los PAs (DPA) y del periodo refractario cardiaco. La  $I_{K1}$  es, además, la principal responsable del mantenimiento del potencial de membrana durante la fase 4 o de reposo de dichas células cardiacas. Una propiedad muy característica de los canales que generan la  $I_{K1}$  es la “rectificación interna” que consiste en que los canales presentan mayor conductancia cuando el  $K^+$  entra en la célula a potenciales de membrana más negativos que el potencial de equilibrio del  $K^+$  ( $E_K$ ) que cuando éste sale de la célula a potenciales más positivos del  $E_K$ . La rectificación interna se debe al bloqueo del canal por parte de las poliaminas y del  $Mg^{2+}$ . Por otra parte, el fosfatidil-4,5-inosfato ( $PIP_2$ ) es indispensable para aumentar la probabilidad de apertura del canal. En el miocardio humano se ha descrito la presencia de 3 tipos de canales que generan esta corriente: Kir2.1, 2.2 y 2.3. La densidad de la  $I_{K1}$  es 6 veces mayor en tejido ventricular que en auricular diferencia que se atribuye a la expresión no uniforme de los clones de los canales que generan los canales Kir2.x. Se ha observado que la principal determinante de la  $I_{K1}$  humana es la proteína Kir2.1. De hecho mutaciones tanto de pérdida como de ganancia de función del gen que lo codifica (KCNJ2) producen el síndrome de Andersen-Tawil y el síndrome del QT corto tipo 3, respectivamente.

La fibrilación, tanto auricular (FA) como ventricular (FV), es una actividad eléctrica rápida y turbulenta que da lugar a la pérdida de función contráctil por parte del miocardio. En la actualidad ambas representan un importante problema sanitario, siendo la FA la arritmia con mayor prevalencia. Está ampliamente aceptado que estas arritmias se generan por la “reentrada” de impulso cardiaco en forma de rotores. Se ha descrito que el aumento en la amplitud de  $I_{K1}$  provoca un aumento en la frecuencia y la estabilidad de estos rotores. Además, el aumento en la expresión de los canales Kir2.1 observado en FA se ha identificado como una de las causas del limitado éxito de la terapéutica convencional de la FA con fármacos antiarrítmicos tipo Ic (flecainida y propafenona). Se ha propuesto que la inhibición selectiva de la  $I_{K1}$  auricular podría ser una alternativa eficaz y segura para el tratamiento farmacológico de la FA. Sin embargo, hoy en día se desconocen los determinantes moleculares de la modulación farmacológica de los canales que generan la  $I_{K1}$  humana.

Por lo tanto, los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron:

1. Analizar los efectos de la flecainida sobre la sobre las corrientes generadas por los canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 humanos registrados en sistemas de expresión heterólogos y sobre la  $I_{K1}$  auricular humana.

2. Identificar el/los sitios de unión de la flecainida al canal y describir el mecanismo mediante el cual dicha unión provoca los efectos observados.

3. Analizar los efectos de la propafenona sobre las corrientes generadas por los canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 humanos registrados en un sistemas de expresión heterólogos y sobre la  $I_{K1}$  auricular humana.

4. Identificar el/los sitios de unión de la propafenona al canal y describir el mecanismo mediante el cuales dicha unión provoca los efectos observados.

## MÉTODOS Y RESULTADOS

Estudiamos primero los efectos de la flecainida sobre la corriente generada por los canales cardiacos humanos de la familia Kir2.x transfectados transitoriamente en células CHO mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula entera.

La flecainida aumentaba la corriente generada por homotetrámeros de subunidades Kir2.1 ( $I_{Kir2.1}$ ), efecto que es más acusado a potenciales fisiológicos. Este efecto no se observó en corrientes generadas por canales homotetraméricos de Kir2.2, Kir2.3, ni cuando los canales estaban formados por heterotetrámeros. En miocitos auriculares humanos y de cobayo, no se observaron cambios en la amplitud de  $I_{K1}$ , al perfundir con flecainida 1  $\mu$ M. Sin embargo en los miocitos ventriculares de cobayo, donde la contribución de Kir2.1 a la  $I_{K1}$  es mayor, si se observó un aumento de la amplitud de  $I_{K1}$  en presencia de flecainida.

En experimentos de registro de corrientes generadas por un solo canal (*single channel*), se observó que en presencia de 1  $\mu$ M de flecainida la frecuencia de apertura, la probabilidad de apertura y el tiempo de permanencia en estado abierto del canal aumentaron significativamente, efecto idéntico al producido por un aumento en la interacción del PIP<sub>2</sub> al canal. La flecainida no modificó la corriente generada por el mutante de menor afinidad por el PIP<sub>2</sub>, Kir2.1L222I, demostrando que el PIP<sub>2</sub> es necesario para producir el aumento de corriente inducido por flecainida.

Mediante experimentos de parche escindido (*inside-out*) demostramos que la flecainida desplaza hacia la derecha y hacia abajo la curva concentración-efecto del bloqueo producido por espermina, lo que sugería que la flecainida disminuía la afinidad del canal por las poliaminas mediante una modulación alostérica. Además, la flecainida no era capaz de aumentar la corriente generada por canales Kir2.1 con mutaciones dirigidas en los residuos que determinan la unión de las poliaminas.

Para identificar el sitio receptor de la flecainida se construyó un modelo molecular de la estructura del canal utilizando las estructuras descritas mediante difracción de rayos X de las proteínas cristalizadas de los dominios transmembrana y citoplasmáticos. Los experimentos de *docking* ciego demostraron que el sitio de unión de más baja energía correspondía a la región de la hoja  $\beta$ I del dominio citoplasmático. Mediante experimentos de *docking* manual se identificó la interacción de la flecainida con la Cys311. Esta interacción fue corroborada mediante experimentos de mutagénesis dirigida.

La flecainida 1  $\mu$ M también aumenta la corriente generada por canales Kir2.1 *wild-type* (WT) y con mutaciones que generan síndrome de Andersen-Tawil, tras la incubación durante 24 h.

La propafenona a dosis altas (50  $\mu$ M) disminuye significativamente las corrientes, tanto de entrada como de salida, generadas por canales homotetraméricos y heterotetraméricos de Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3. Además, abole la rectificación interna del canal, por lo que la corriente a potenciales positivos del  $E_K$  es una función lineal del voltaje. Tras analizar el efecto producido en la  $I_{K1}$  de miocitos auriculares humanos, se demostró que el orden de potencia de bloqueo era la siguiente Kir2.3= $I_{K1}$ >Kir2.2>Kir2.1. Sin embargo, el bloqueo por propafenona de las corrientes de los mutantes Kir2.1L222I (un mutante con baja afinidad por el PIP<sub>2</sub>) como Kir2.3I213L (un mutante con alta afinidad por el PIP<sub>2</sub>) no era distinto al de los canales WT.

Al analizar las corrientes unitarias de Kir2.1 mediante *single channel* se observaron sólo 2 picos en el histograma de amplitudes en condiciones control, que corresponden a los estados abierto y cerrado del canal, mientras que en presencia de propafenona se observaron 3 sub-estados abiertos adicionales.

Los experimentos de *inside-out* de Kir2.1 demostraron que tras la perfusión de propafenona en el lado interno de la membrana, el estado estacionario del bloqueo se alcanzaba con un curso temporal de bloqueo lento, similar al observado al perfundir el

fármaco extracelularmente en configuración de célula entera, lo que confirma que la propafenona no bloquea el canal al nivel del poro. Además, en presencia de propafenona, el tiempo necesario para alcanzar un 50% de reducción de corriente inducido por neomicina, se redujo significativamente, lo que sugiere que el fármaco debilita la interacción canal-PIP<sub>2</sub>. En otro grupo de experimentos, inhibimos toda la corriente de los parches con neomicina, y posteriormente perfundimos con concentraciones crecientes de PIP<sub>2</sub>, para poder recuperar la amplitud de corriente inicial. En presencia de propafenona, el efecto agonista del PIP<sub>2</sub>, era significativamente menor, demostrando que éste fármaco disminuye la sensibilidad del canal al PIP<sub>2</sub>. Esta demostrado que los mutantes de Kir2.1 con baja afinidad por poliaminas también muestran baja afinidad por PIP<sub>2</sub>. Nuestros resultados demuestran que en casi todos estos mutantes, el bloqueo inducido por propafenona era significativamente mayor que en canales Kir2.1 WT, demostrando que las poliaminas podrían estar actuando como cofactores del PIP<sub>2</sub>.

Los experimentos de *docking* ciego y mutagénesis dirigida demostraron que la propafenona se une a los canales Kir2.x en el dominio citoplasmático, cerca pero no dentro del poro, en un sitio de unión en el que están implicadas dos Arg conservadas (R228 y R260 en Kir2.1).

## CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que la flecainida aumenta  $I_{Kir2.1}$  por dos mecanismos simultáneos: a) favoreciendo la interacción del PIP<sub>2</sub> con el canal y b) disminuyendo la afinidad de las poliaminas por el mismo lo que disminuye la rectificación interna de la corriente. Estos efectos son producidos alostéricamente como consecuencia de la unión a la Cys311 localizada en el dominio citoplasmático de los canales Kir2.1 que no está presente en los canales Kir2.2 y Kir2.3 lo que justifica la selectividad de su efecto.

Por otra parte, la propafenona inhibe la corriente generada por las tres isoformas de Kir2 humanas cardíacas mediante un novedoso mecanismo que no ha sido descrito antes para ningún otro fármaco. Este mecanismo consiste en la unión alostérica de la propafenona al dominio citoplasmático, que disminuye la carga negativa total que perciben los iones K<sup>+</sup> y las poliaminas, lo que promueve la aparición de subniveles de conductancia y disminuye la afinidad del canal por el PIP<sub>2</sub>.

## ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Electrofisiología cardíaca.....</b>	<b>3</b>
1.1. Excitabilidad.....	4
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular.....	6
1.1.2. El potencial de acción.....	8
1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de $Na^+$ .....	8
1.1.2.b. PA lentos o dependientes de $Ca^{2+}$ .....	12
1.2. Automatismo.....	12
1.3. Refractoriedad.....	13
1.4. Propagación del impulso cardíaco.....	15
<b>2. Canales iónicos dependientes de voltaje implicados en el potencial de acción cardíaco.....</b>	<b>17</b>
2.1. Canales de $Na^+$ .....	17
2.1.1. Estructura de los canales de $Na^+$ .....	17
2.1.2. Características de la $I_{Na}$ .....	20
2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de $Na^+$ cardíacos.....	21
2.2. Canales de $Ca^{2+}$ .....	22
2.2.1. Estructura de los canales de $Ca^{2+}$ .....	22
2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$ .....	25
2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{Ca,L}$ .....	26
2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de $Ca^{2+}$ tipo L.....	27
2.3. Canales de $K^+$ .....	27
2.3.1. Canales 6TM/1P.....	29
2.3.1.a. Estructura de los canales Kv.....	31
I. La subunidad $\alpha$ .....	32
II. Subunidades auxiliares.....	34
2.3.1.b. La inactivación de los canales Kv.....	37
2.3.1.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco.....	38
I. La $I_{to}$ .....	38
I.a. Características de la $I_{to1}$ .....	39
I.b. Composición de los canales que generan la $I_{to1}$ .....	39
I.c. La $I_{to1}$ en diversas patologías.....	42



II. La $I_{Kur}$ .....	43
II.a. Características de la $I_{Kur}$ .....	43
II.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kur}$ .....	44
II.c. La $I_{Kur}$ en diversas patologías.....	45
III. La $I_{Kr}$ .....	45
III.a. Características de la $I_{Kr}$ .....	46
III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$ .....	47
III.c. La $I_{Kr}$ en diversas patologías.....	48
III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades $Kv11.1$ y $MiRP1$ .....	48
IV. La $I_{Ks}$ .....	49
IV.a. Características de la $I_{Ks}$ .....	49
IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$ .....	50
IV.c. Canalopatías asociadas a las subunidades $Kv7.1$ y $minK$ .....	51
2.3.2. Canales 4TM/2P.....	51
<b>3. Canales 2TM/1P.....</b>	<b>53</b>
3.1. Una familia de canales de $K^+$ con rectificación interna.....	53
3.2. La rectificación interna en los canales $K_{ir}$ .....	55
3.2.1. Propiedades de la rectificación interna “clásica”.....	55
3.2.2. Mecanismos moleculares de la rectificación interna.....	56
3.2.3. Determinantes moleculares de la rectificación interna.....	57
3.3. Estructura de los canales $K_{ir}$ .....	58
3.4. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales $K_{ir}$ .....	68
3.4.1. La $I_{K,ATP}$ .....	69
3.4.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$ .....	69
3.4.1.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$ .....	69
3.4.1.c. Regulación de la $I_{K,ATP}$ .....	70
3.4.1.d. La $I_{K,ATP}$ en diversas patologías.....	71
3.4.2. La $I_{K,ACh}$ .....	71
3.4.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$ .....	72
3.4.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$ .....	73
3.4.2.c. Regulación de la $I_{K,ACh}$ .....	73
3.4.3. La $I_{K1}$ .....	74
3.4.3.a. Rectificación interna y excitabilidad cardíaca.....	75

3.4.3.b. Localización de la $I_{K1}$ .....	77
3.4.3.c. Composición de los canales que generan la $I_{K1}$ .....	79
3.4.3.d. Propiedades de los canales Kir2.x .....	80
3.4.3.e. Regulación de la $I_{K1}$ .....	82
3.4.3.f. La $I_{K1}$ en diversas patologías .....	86
3.4.3.g. Canalopatías asociadas a los canales Kir2.1 .....	88
<b>4. Arritmias fibrilatorias</b> .....	<b>91</b>
4.1. Génesis de las arritmias fibrilatorias .....	92
4.2. Dinámica de los rotors .....	95
4.3. Formación de los rotors .....	97
4.4. Papel de la $I_{K1}$ en el mantenimiento de los rotors .....	98
<b>5. Fármacos antiarrítmicos</b> .....	<b>101</b>
5.1. Clasificación .....	102
5.2. Farmacología de los FAA del grupo I .....	102
5.2.1. Mecanismo general de acción .....	103
5.2.2. FAA del grupo Ic .....	104
5.2.2.a. Acciones farmacológicas .....	105
5.2.2.b. Características farmacocinéticas .....	105
5.2.2.c. Aplicaciones terapéuticas .....	106
5.2.2.d. Reacciones adversas e interacciones .....	107
5.2.2.e. Efectos sobre las corrientes cardiacas .....	108
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>115</b>
<b>III. RESULTADOS</b> .....	<b>119</b>
<b>1. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification</b> .....	<b>121</b>
<b>2. Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore</b> .....	<b>139</b>

<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	<b>155</b>
<b>1. Efectos de la flecainida sobre canales Kir2.x</b> .....	<b>157</b>
1.1. La flecainida aumenta la $I_{Kir2.1}$ pero no la $I_{Kir2.2}$ o la $I_{Kir2.3}$ .....	157
1.2. La flecainida aumenta la densidad de canales Kir2.1 en la membrana.....	157
<b>2. Implicaciones terapéuticas</b> .....	<b>159</b>
<b>3. Efectos de la propafenona sobre canales Kir2.x</b> .....	<b>161</b>
<b>4. Conclusiones</b> .....	<b>165</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>167</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>171</b>

## **Abreviaturas**



4-AP: 4-Aminopiridina	$\Delta G$ : Energía de Gibbs
ACh: Acetilcolina	GTP: Guanosín trifosfato
ADN: Ácido desoxirribonucleico	$[H^+]_i$ : Concentración intracelular de protones
ADP: Adenosín difosfato	HcN: Canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos ( <i>Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide-gated channels</i> )
AKAP: Proteína de anclaje para la PKA	HEK293: Células embrionarias humanas de riñón ( <i>Human Embryonic Kidney cells</i> )
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	hERG: <i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>
AsODN: Oligonucleótidos antisentido ( <i>Antisense oligonucleotides</i> )	HTA: Hipertensión arterial
ATP: Adenosín trifosfato	HVA: <i>High-Voltage Activated</i>
AV: Aurículo-ventricular	<i>I</i> : Intensidad de corriente macroscópica
$[Ca^{2+}]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de $Ca^{2+}$	<i>i</i> : Intensidad de corriente unitaria
CaM: Calmodulina	IC <sub>50</sub> : Concentración que produce la mitad de la inhibición máxima observada
CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de $Ca^{2+}$ /CaM	$I_{Ca}$ : Corriente de entrada de $Ca^{2+}$
CCh: Carbacol	$I_{Ca,L} / I_{Ca,T}$ : $I_{Ca}$ generada por canales tipo L/tipo T
CE <sub>50</sub> : Concentración que produce la mitad del efecto máximo observado	$I_A$ : Corriente transitoria de salida de $K^+$ en neuronas
CHO: Células de ovario de hámster chino ( <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> )	$I_f$ : Corriente hiperpolarizante marcapasos ( <i>funny current</i> )
$C_m$ : Capacitancia de la membrana celular	$I_{K1}$ : Corriente de $K^+$ con rectificación interna
$C_{max}$ : Concentración máxima que alcanza un fármaco en una zona de prueba tras su administración	$I_{K,ACh}$ : Corriente de salida de $K^+$ activada por ACh
C-terminal: Carboxilo-terminal	$I_{K,ATP}$ : Corriente de $K^+$ sensible a ATP
CTX: Caribdotoxina	$I_{Kir2}$ : Corriente de $K^+$ generada por canales Kir2
CYP2D6: Citocromo P450	$I_{Kr}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación rápida
D: Dominio	$I_{Ks}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación lenta
DEANO: 2-(N,N-Dietilamino)-diazanolato	$I_{Kur}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación ultrarrápida
DHP: 1,4-Dihidropiridinas	$I_{Na}$ : Corriente de entrada de $Na^+$
DIA: Dominio de interacción $\alpha$ del canal de $Ca^{2+}$	$I_{Na,L}$ : Corriente tardía de entrada de $Na^+$
DIB: Dominio de interacción $\beta$ del canal de $Ca^{2+}$	$I_{NCX}$ : Corriente del intercambiador $Na^+/Ca^{2+}$
DPA: Duración del potencial de acción	$[ion]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular del ion
DPA <sub>n</sub> : DPA medida al n % de la repolarización	$I_{to1}$ : Corriente transitoria de salida de $K^+$ cardíaca
DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas	$I_{to2}$ : Corriente transitoria de salida de $Cl^-$ activada por $Ca^{2+}$
DTX: Dendrotoxina	I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje
ECG: Electrocardiograma	<i>k</i> : Valor de la pendiente de la curva
$E_K$ : Potencial de Nernst para el $K^+$	$[K^+]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de $K^+$
$E_m$ : Potencial de membrana	$K_{ACh}$ : Canales de $K^+$ activados por ACh
$E_{Na}$ : Potencial de Nernst para el $Na^+$	$K_{Ca}$ : Canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$
ET <sub>A</sub> : Receptor de endotelina-1	
<i>F</i> : Constante de Faraday ( $9.65 \times 10^4$ C/mol)	
$f_o$ : Frecuencia de apertura del canal	
FA: Fibrilación auricular	
FV: Fibrilación ventricular	

KChAP: $K^+$ Channel-Associated Protein	SQTC: Síndrome de QT corto
KChIP: $K_v$ Channel Interacting Protein	SQTL: Síndrome de QT largo
Kir: Canales de $K^+$ rectificadores internos	SUR: Receptor de sulfonilureas
$K_v$ : Canales de $K^+$ dependientes de voltaje	$\tau$ : Constante de tiempo
LO: Longitud de onda	$T$ : Temperatura absoluta
<i>Ltk</i> : Fibroblastos de ratón carentes de tirosina quinasa	TALK: <i>TWIK-related Alkalosis-activated <math>K^+</math> channels</i>
LVA: <i>Low-Voltage Activated</i>	TASK: <i>TWIK-related Acid-Sensitive <math>K^+</math> channels</i>
minK: <i>Minimal <math>K^+</math> channel subunit</i>	TEA: Tetraetilamonio
MiRP: <i>MinK-Related Peptides</i>	THIK: <i>Tandem pore domain Halothane Inhibited <math>K^+</math> channels</i>
mito $K_{ATP}$ : Canal $K_{ATP}$ mitocondrial	TM: Transmembrana (segmento)
$[Na^+]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de $Na^+$	TRAAK: <i>TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated <math>K^+</math> channels</i>
NAB: <i>N-terminal A and B box</i> , también dominio T1	TREK: <i>TWIK-RElated <math>K^+</math> channels</i>
NBD: Dominios de unión de nucleótidos	TTX: Tetrodotoxina
NCX: Intercambiador $Na^+/Ca^{2+}$	TVPC: Taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas
N-terminal: Amino-terminal	TWIK: <i>Tandem of P domains in Weak Inward rectifier <math>K^+</math> channels</i>
ODC: Ornitina descarboxilasa	$V$ : Voltaje
$P_{ion}$ : Permeabilidad de la membrana a un determinado ion	VC: Velocidad de conducción
$P_o$ : Probabilidad de apertura del canal	$V_{max}$ : Velocidad máxima de la fase 0
PA: Potencial de acción	WT: <i>Wild type</i>
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )	
PIP <sub>2</sub> : Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato	
PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc	
PKC: Proteína quinasa C	
PMA: Miristato-acetato de forbol ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )	
PR: Potencial de reposo	
PRE: Periodo refractario efectivo	
$Q$ : Carga	
Qss: <i>Quasi-Steady-State</i> del canal $K_{ACh}$	
$R$ : Constante universal de los gases (8.31 J/mol·K)	
RS: Ritmo sinusal	
RyR1: Receptor/canal de rianodina tipo 1	
RyR2: Receptor/canal de rianodina tipo 2	
SA: Senoauricular	
SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa	
sarc $K_{ATP}$ : Canal $K_{ATP}$ del sarcolema	
SAT: Síndrome de Andersen-Tawil	
SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen	
SNC: Sistema nervioso central	
SNP: Sistema nervioso periférico	

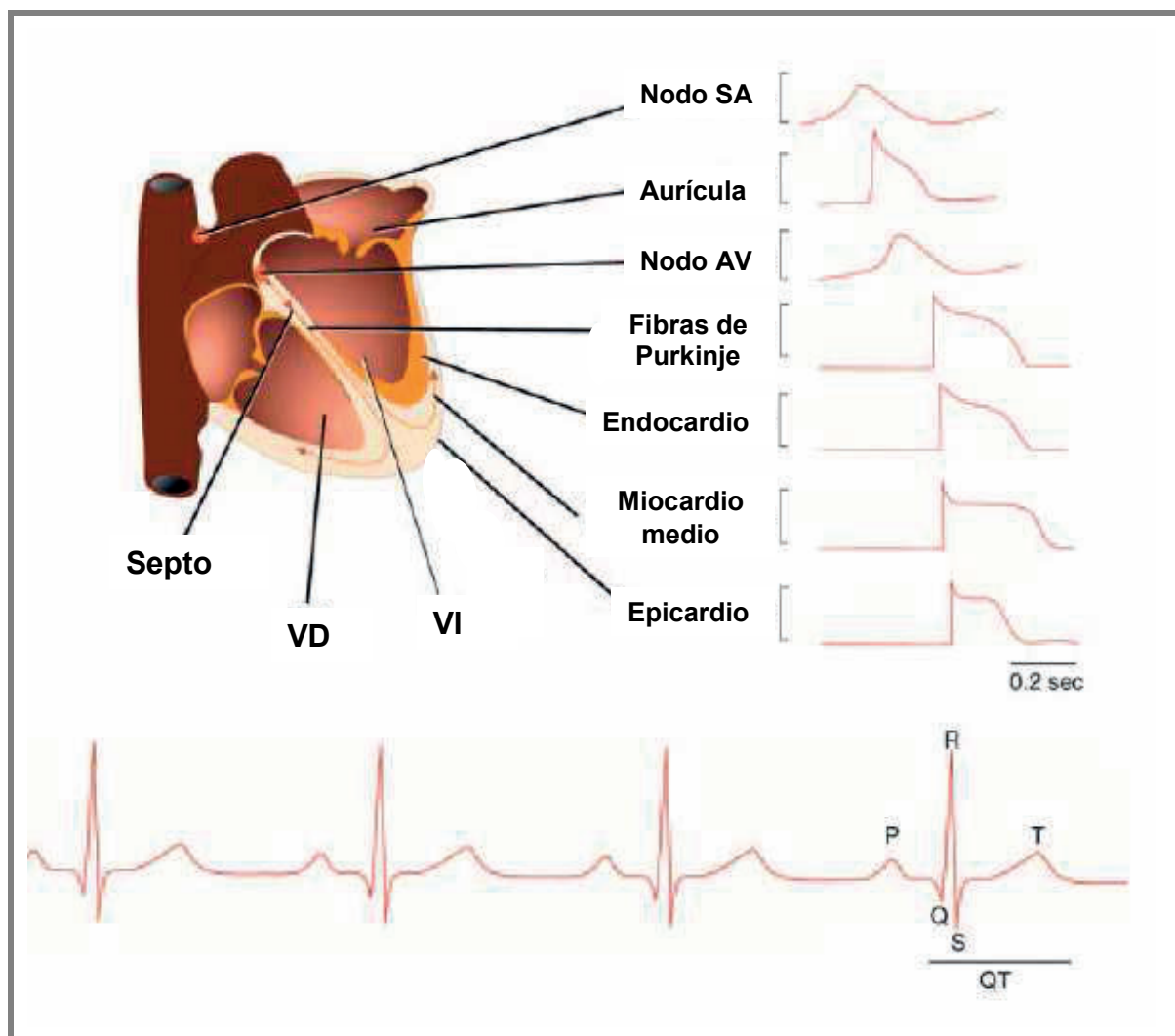
# **I. INTRODUCCIÓN**





## 1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción rítmica del miocardio. En el corazón además del tejido muscular auricular y el ventricular, de los que depende su capacidad contráctil encontramos las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.



**Figura 1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio.** Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (Figura 1). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las

células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), única vía que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2010).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

### 1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla 1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$(1) \quad \Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i)$$

donde  $\Delta G$  es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión,  $R$  es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K),  $T$  es la temperatura absoluta y  $[ion]_e$  e  $[ion]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde.

Así, si la membrana es únicamente permeable al  $K^+$ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado), por lo que el interior se tornará más negativo, con lo que volverá a atraer iones  $K^+$  hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$(2) \quad \Delta G = -E \cdot z \cdot F$$

donde  $E$  es el potencial transmembrana,  $z$  es la valencia del ion en cuestión y  $F$  es la constante de Faraday ( $9.65 \times 10^4$  C/mol). Con la salida progresiva de  $K^+$  de la célula, llega un punto en el que el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$(3) \quad E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i)$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$(4) \quad E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i)$$

El potencial al que el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla 1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] <sub>e</sub> (mM)	[Ion] <sub>i</sub> (mM)	Potencial de equilibrio
Na <sup>+</sup>	135-145	12	+67
K <sup>+</sup>	3.5-5	155	-96
Cl <sup>-</sup>	123	4.2	-90
Ca <sup>2+</sup>	1.5	10 <sup>-4</sup>	+129

**Tabla 1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas.** Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana ( $E_m$ ) y viene determinada por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares presentan un  $E_m$  de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el  $E_m$  es de entre -45 y -65 mV. En las células auriculares y ventriculares el valor del  $E_m$  se mantiene constante si la célula no se estimula. A esta diferencia de potencial se le denomina potencial de reposo (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente. Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo

mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al  $K^+$ , el  $E_m$  debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el  $K^+$  ( $E_K$ ). Sin embargo, el valor del  $E_m$  es menos negativo que el del  $E_K$  debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el  $E_m$  depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana ( $P_{ion}$ ) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el  $E_m$  en las células permeables al  $Na^+$ , al  $Cl^-$  y al  $K^+$ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$(5) \quad E_m = \left( \frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[ \frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right]$$

donde  $P_K$ ,  $P_{Na}$  y  $P_{Cl}$  representan la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , al  $Na^+$  y al  $Cl^-$ , respectivamente.

### 1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$  están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el  $K^+$  y los aniones orgánicos son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta  $10^8$  iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion en su forma hidratada como en

su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.

- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal (abierto-conductor y cerrado e inactivo-no conductor). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados (“gating” del canal) se producen de forma muy rápida ( $<10 \mu\text{s}$ ). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del  $E_m$ ), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de moduladores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el  $\text{Ca}^{2+}$  o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974) y cuya magnitud es muy pequeña, ya que en este proceso se produce un desplazamiento de carga equivalente al movimiento lineal de  $\approx 12-13$  electrones (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana. Estas proteínas sólo pueden fijar una o unas pocas moléculas al mismo tiempo para transferirlas al otro lado de la membrana, por lo que la velocidad de transporte es más lenta que la de los canales iónicos ( $10^2-10^4$  moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores:

- Las bombas iónicas son enzimas de membrana que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para transportar iones a través de la membrana en contra de gradiente en un proceso denominado “transporte activo”. Debido a su mecanismo, se denominan ATPasas.
- Los cotransportadores o intercambiadores, al igual que las bombas iónicas, trasladan moléculas en contra de su gradiente de concentración, aunque en este caso la energía que alimenta el proceso procede de la difusión de otras moléculas, normalmente iones  $\text{Na}^+$ . Si los iones  $\text{Na}^+$  se mueven en la misma dirección que la molécula transportada se habla de un cotransportador, mientras que si se mueven en dirección contraria se habla de un intercambiador. Posteriormente, las ATPasas se encargan de restaurar el gradiente de  $\text{Na}^+$ . Por este motivo, a este proceso se le denomina “transporte activo secundario”.

## 1.1.2. El Potencial de acción

Las células cardíacas son excitables, es decir, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan una respuesta eléctrica o PA al que se acopla la respuesta contráctil. Por el contrario, cuando no se alcanza el potencial umbral, sólo se genera una respuesta local que no se propaga a las células colindantes: es un estímulo “todo o nada”. El PA es un cambio transitorio en la polaridad de la membrana resultante de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la misma a los diferentes iones. La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +40 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización.

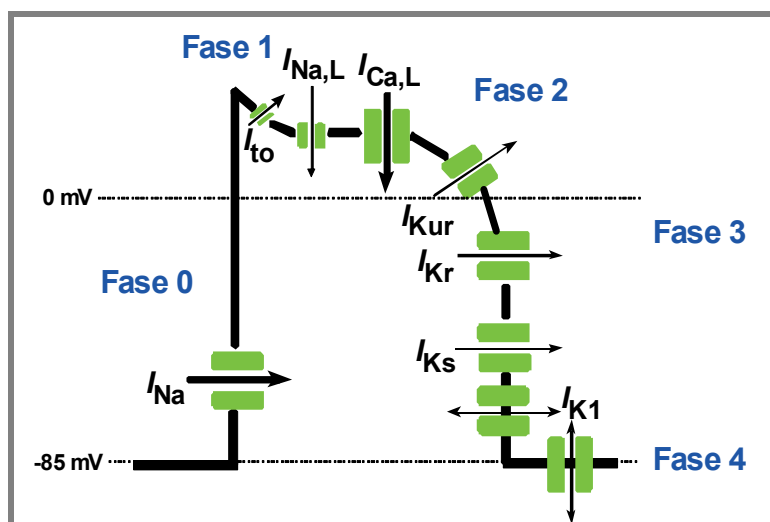
Parámetro	PA Na <sup>+</sup> -dependiente	PA Ca <sup>2+</sup> -dependiente
Corriente despolarizante en la fase 0	$I_{Na}$	$I_{Ca}$
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-45 a -65
Velocidad de conducción (m/s)	0.5-4	0.01-0.1
Amplitud del PA (mV)	100-130	40-85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200-1000	2-15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Se abole por	TTX, anestésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , La <sup>3+</sup>

**Tabla 2. Características de los PA rápidos y lentos.** TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

En el corazón se registran PA de diversos tipos (Figura 1). En las células auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de Na<sup>+</sup>, mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de Ca<sup>2+</sup>. Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de Na<sup>+</sup>” y células que generan PA lentos o “dependientes de Ca<sup>2+</sup>” (Tabla 2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Verecke, 1979).

1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de Na<sup>+</sup>

Los PA rápidos o dependientes de Na<sup>+</sup> presentan 5 fases (Figura 2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2010).



**Figura 2. PA auricular rápido o “dependiente de  $\text{Na}^+$ ”.** Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo (PR  $\approx -85$  mV) hasta valores positivos ( $\approx +30$  mV). La activación de la  $I_{\text{Na}}$  es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento ( $I_{\text{Na,L}}$ ) que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la  $I_{\text{Na}}$  determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondegheem, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la  $I_{\text{Na}}$  (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje: a) la corriente transitoria ( $I_{\text{to1}}$ ), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la duración del PA (DPA) sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y b) el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación ( $I_{\text{Kur}}$ ), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993a).

La fase 2 (o fase de meseta) representa el delicado equilibrio entre dos corrientes de entrada, la  $I_{\text{Na,L}}$  (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de  $\text{K}^+$  de activación ultrarrápida, rápida y lenta ( $I_{\text{Kur}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$  e  $I_{\text{Ks}}$ , respectivamente)



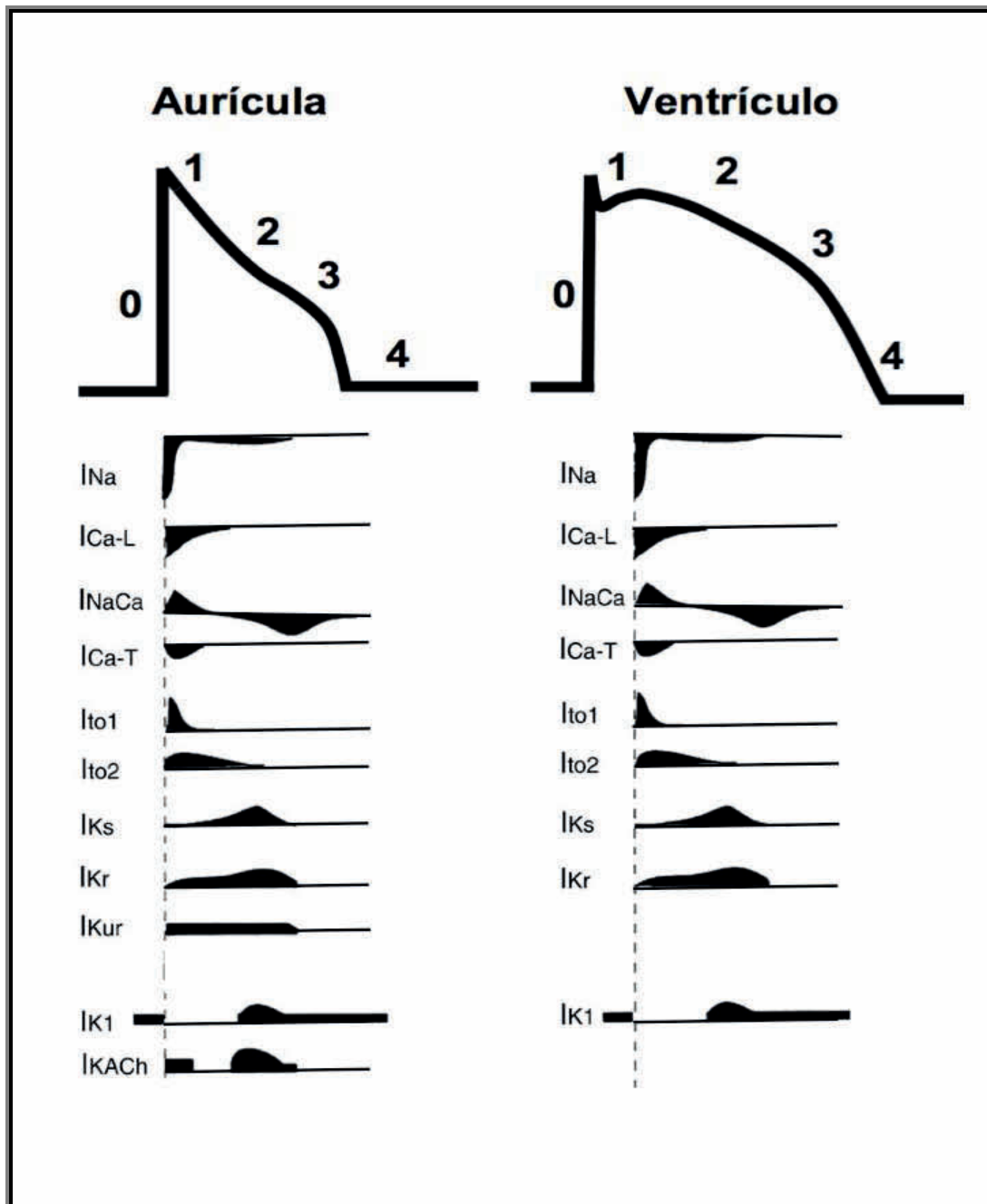
(Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993a y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el  $E_m$  alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante esta fase se produce la salida de  $K^+$  a través de canales que presentan rectificación interna ( $I_{K1}$ ), lo que acelera la fase final de la repolarización (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, del sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico  $M_2$  y de adenosina  $A_1$ , ambos acoplados a proteínas  $G_i$ ) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de  $K^+$  activada por ACh ( $I_{K,ACh}$ ) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la  $I_{K,ACh}$  en las células auriculares hiperpolariza el  $E_m$  y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

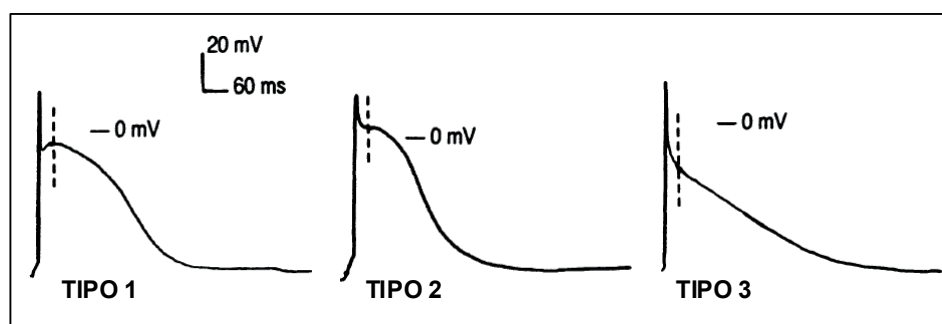
La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares esta fase es isoelectrónica y, por lo tanto, el  $E_m$  se mantiene constante durante el periodo comprendido entre el final de un PA y el comienzo del siguiente. El mantenimiento del  $E_m$  en niveles constantes durante la fase 4 se debe principalmente a la  $I_{K1}$  (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), aunque también participan la activación de la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX).

En la Figura 3 se muestran todas las corrientes implicadas en la génesis y en el mantenimiento del PA cardiaco en células auriculares y ventriculares. Al comparar la morfología de los PA auriculares y ventriculares se observa que la DPA es mayor en células ventriculares, lo que constituye un mecanismo protector que evita que las primeras puedan responder a frecuencias auriculares muy rápidas o a una estimulación prematura del corazón. Dentro del tejido auricular y ventricular se han identificado diferencias en la morfología y en la duración de los PAs (Figuras 1 y 3), lo que ha sido atribuido a la diferencia de densidad y del tipo de canal iónico expresado.

Clásicamente, al menos dos tipos de PA han sido registrados en preparaciones de aurícula derecha AD humana: uno con un pico prominente de repolarización rápida, seguido por una meseta y otro sin pico, y con una fase de meseta de mayor duración (Trautwein y cols., 1962; Gelband y cols., 1972). Más recientemente, se han identificado 3 tipos celulares en AD humana en cuanto a la morfología de su PA. Las distintas morfologías se han asociado a diferencias en las corrientes de  $K^+$  implicadas en la repolarización. (Figura 4) (Wang y cols., 1993a, Caballero y cols., 2010).



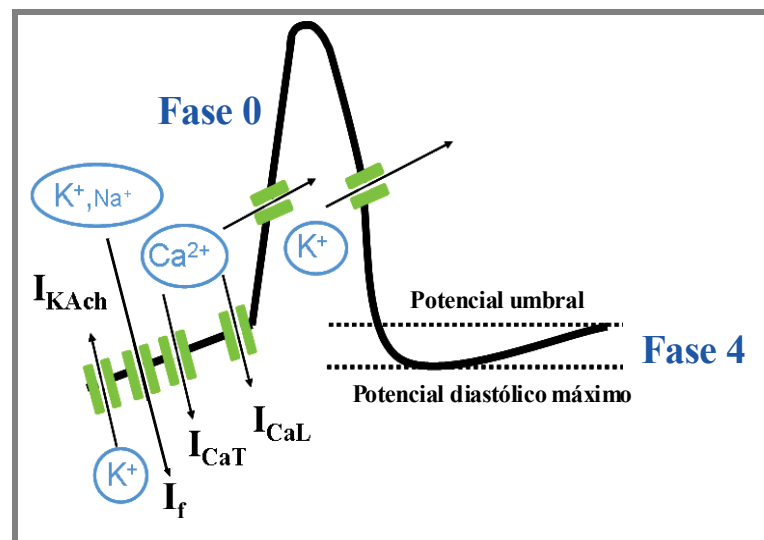
**Figura 3.** Representación esquemática de PA auriculares y ventriculares con las respectivas corrientes iónicas que determinan su morfología. [Adaptada de Roberts, 2006]



**Figura 4.** Caracterización de tres tipos de PA registrados en miocitos auriculares humanos. [Adaptada de Wang y cols., 1993].

1.1.2.b. PA lentos o dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ 

Los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan en las células de los nodos SA y AV, cuyo PR es de  $\approx -55$  mV) (Figura 5). A este potencial, la  $I_{\text{Na}}$  está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA en estas células se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. También se generan PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975).



**Figura 5.** PA lento o “dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La activación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  es mucho más lenta que la de la  $I_{\text{Na}}$ , por lo que la amplitud de los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  es menor ( $\approx 70-80$  mV) y su propagación mucho más lenta (0,02-0,05 m/s), lo que explica su denominación de PA lentos (Isenberg y Klockner, 1982; Noble, 1984). La fase 2 (de meseta) se debe a un equilibrio entre la inactivación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  y la activación de la  $I_{\text{Kr}}$ , y la fase 3 (de rápida repolarización) se debe a la activación de las corrientes de  $\text{K}^+$  rectificadoras tardías.

## 1.2. Automatismo

Aunque todos los miocitos cardiacos son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunos, además, presentan actividad automática intrínseca, es decir, son capaces de generar PA de forma espontánea. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje presentan actividad automática, careciendo de ella las células musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en

estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del  $E_m$  hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica (Figura 5).

Una característica de las células automáticas dependientes de  $\text{Na}^+$  es que cuando son estimuladas a una frecuencia mayor a la suya, tanto la inclinación de la fase 4 como la frecuencia de disparo disminuyen. Esta característica se denomina “supresión por sobreestimulación” (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a  $\approx 15$  latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

El mecanismo responsable de la fase 4 de lenta despolarización diastólica varía en los distintos tejidos cardíacos automáticos. En las células del sistema His-Purkinje esta fase se debe a la activación mantenida de la corriente hiperpolarizante marcapasos o “*funny current*” ( $I_f$ ), una corriente de entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  generada a través de canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), y a la reducción de la  $I_K$  previamente activada durante la fase 3 del PA. La  $I_f$  se activa durante la fase 3 cuando el  $E_m$  se hace más negativo de -50 mV (DiFrancesco, 2006; Baruscotti y cols., 2010). En las células de los nodos SA y AV, cuando el  $E_m$  alcanza valores de -50 mV se activa, además de la  $I_f$ , la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo T ( $I_{\text{Ca,T}}$ ), lo que acelera la fase final de la despolarización diastólica (Irisawa y Hagiwara, 1988). Finalmente, cuando se alcanza el potencial umbral, se activa la  $I_{\text{Ca,L}}$ , que es la corriente responsable de la fase 0 del PA en estas células.

### 1.3. Refractariedad

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de  $\text{Na}^+$ , el periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la  $I_{\text{Na}}$ . Los canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor en el que permanecen hasta que la

repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de  $\text{Na}^+$ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y el comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el  $E_m$  se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de  $\text{Na}^+$  pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá más lentamente. Por lo tanto, existe un periodo de tiempo durante el cual la célula es excitable, pero en el que aún no ha recuperado la excitabilidad completamente. Durante este periodo de tiempo, denominado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la  $I_{\text{Na}}$  todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si en este momento se genera un PA prematuro, éste va a presentar menor amplitud y una duración más corta que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares ( $\approx 200$  ms en las primeras frente a los  $\approx 300$  ms de las segundas), lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco, disminuyendo su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la  $I_{\text{Ca,L}}$ , corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Pérez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractariedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

#### 1.4. Propagación del impulso cardíaco

La propagación del impulso cardíaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardíacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo que controlan la excitabilidad y la refractariedad. Por otro lado, la conducción del impulso cardíaco dependerá del acoplamiento intercelular y de las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

$$(6) \quad Q = E_m \cdot C_m$$

donde  $Q$  es la carga acumulada y  $C_m$  la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La  $C_m$  impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el  $E_m$  debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardíacos están unidos entre sí por los discos intercalares, que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ( $1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia longitudinal o intracelular, determinada por las uniones estrechas y el citoplasma, es mínima, lo que permite un acoplamiento célula-célula que facilita la propagación sincrónica del impulso cardíaco.



conducción intraventricular. El intervalo PR refleja el tiempo de conducción a través del nodo AV, el haz de His y sus ramas, y se prolonga cuando disminuye la velocidad de conducción en dichas estructuras. La duración del intervalo QT refleja el tiempo de repolarización ventricular (Figura 1).

## **2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL PA CARDÍACO**

### **2.1. Canales de Na<sup>+</sup>**

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje son fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005).

El canal de Na<sup>+</sup> presenta, al menos, tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo. Durante la diástole, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de Na<sup>+</sup>. A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de Na<sup>+</sup> (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situación fisiológica, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en estado de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). Además, el canal de Na<sup>+</sup> es la diana farmacológica de los anestésicos locales y de los fármacos antiarrítmicos del grupo I que, a las concentraciones empleadas en terapéutica, se unen con mayor afinidad a los estados abierto e inactivo del mismo (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

#### **2.1.1. Estructura de los canales de Na<sup>+</sup>**

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora  $\alpha$  (de la que se han caracterizado 12 isoformas) y una o varias subunidades



acesorias  $\beta$  ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Figura 7 y Tabla 3) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; George, 2005; Abriel, 2010).

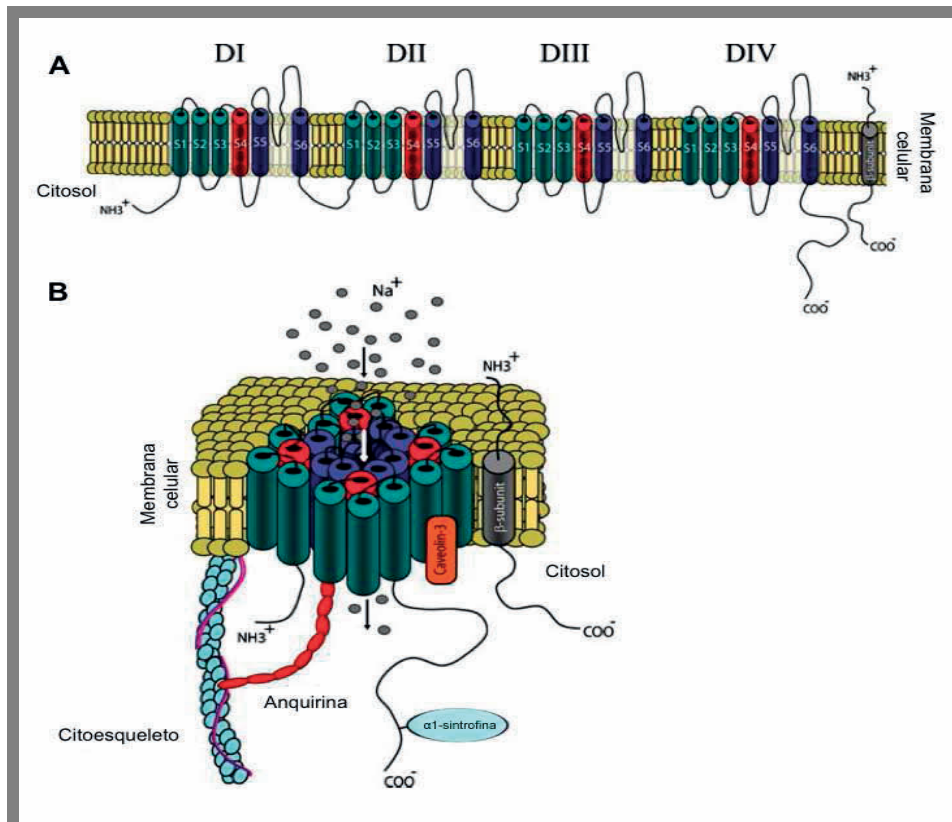
Subunidad $\alpha$				Subunidad $\beta$			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
SCN1A	Nav1.1* ( $\alpha_1$ )	2q24	SNC	SCN1B	Nav $\beta$ 1.1* ( $\beta_1$ )	19q11	SNC
SCN2A	Nav1.2 ( $\alpha_2$ )	2q23	SNC	SCN2B	Nav $\beta$ 2.1* ( $\beta_2$ )	11q24	SNC
SCN3A	Nav1.3* ( $\alpha_3$ )	2q24	SNC	SCN3B	Nav $\beta$ 3.1* ( $\beta_3$ )	11q26	SNC
SCN4A	Nav1.4* ( $\alpha_4$ )	17q21	ME	SCN4B	Nav $\beta$ 4.1 ( $\beta_4$ )	11q24	SNC
SCN5A	Nav1.5* ( $\alpha_5$ )	3p21	MC				
SCN6A	Nav2.1* ( $\alpha_6$ )	2q21-23	Útero				
SCN7A	$\alpha_7$	2q36-37	SNC				
SCN8A	Nav1.6* ( $\alpha_8$ )	2q13	SNC				
SCN9A	Nav1.7	2q24	T				
SCN10A	Nav1.8	3p22	SNP				
SCN11A	Nav1.9	3p21	SNC				
SCN12A		3p23-21.3	SNC				

**Tabla 3. Subunidades que forman el canal de  $\text{Na}^+$  en el hombre.** \*Subunidades que se expresan en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Subunidad  $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los canales de  $\text{Na}^+$  pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia aminoacídica altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y que codifican canales cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).

El gen SCN5A codifica la subunidad  $\alpha$  Nav1.5, responsable de la  $I_{\text{Na}}$  cardíaca. Esta subunidad está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en  $\alpha$ -hélice cada uno (S1 a S6). Los segmentos de cada dominio se conectan mediante secuencias hidrofílicas no conservadas. El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular y forma parte del poro iónico. Los extremos carboxilo- y amino-terminal (C- y N-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003) (Figura 7A). En la membrana la proteína del canal de  $\text{Na}^+$  orienta sus cuatro dominios de forma simétrica de manera que los S5 y S6 junto con los lazos P forman las paredes del poro hidrófilo. Los S1-S4 de los cuatro dominios quedan apartados del poro, rodeados por los fosfolípidos de la membrana. Clásicamente se ha considerado que el S4 queda, a su vez, rodeado por el resto de segmentos TM (Figura 7B).



**Figura 7. Estructura del canal de  $\text{Na}^+$ .** Esquema de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de  $\text{Na}^+$ . (A) En la subunidad  $\alpha$ , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). (B) Estructura del canal plegado en la conformación que adopta en la membrana. [Adaptada de Amin y cols., 2010]

La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los 4 dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presentan un residuo cargado (Arg o Lys) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de  $\text{Na}^+$  y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). La teoría más aceptada acerca del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente ocultas en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002). Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: Asp en DI, Glu en DII, Lys en DIII y Ala en DIV. Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al  $\text{Na}^+$ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de Glu (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) convierte los canales de  $\text{Na}^+$  en selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Heinemann y cols., 1992).

- Subunidades auxiliares

Las principales subunidades reguladoras del canal de  $\text{Na}^+$  son las subunidades  $\beta$ , de las que en la actualidad se conocen 4 isoformas ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Tabla 3) (Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002). Son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular y presentan una secuencia tipo inmunoglobulina que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal, pero regulan el *gating* del mismo, su expresión en la membrana y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom y Catterall, 1996).

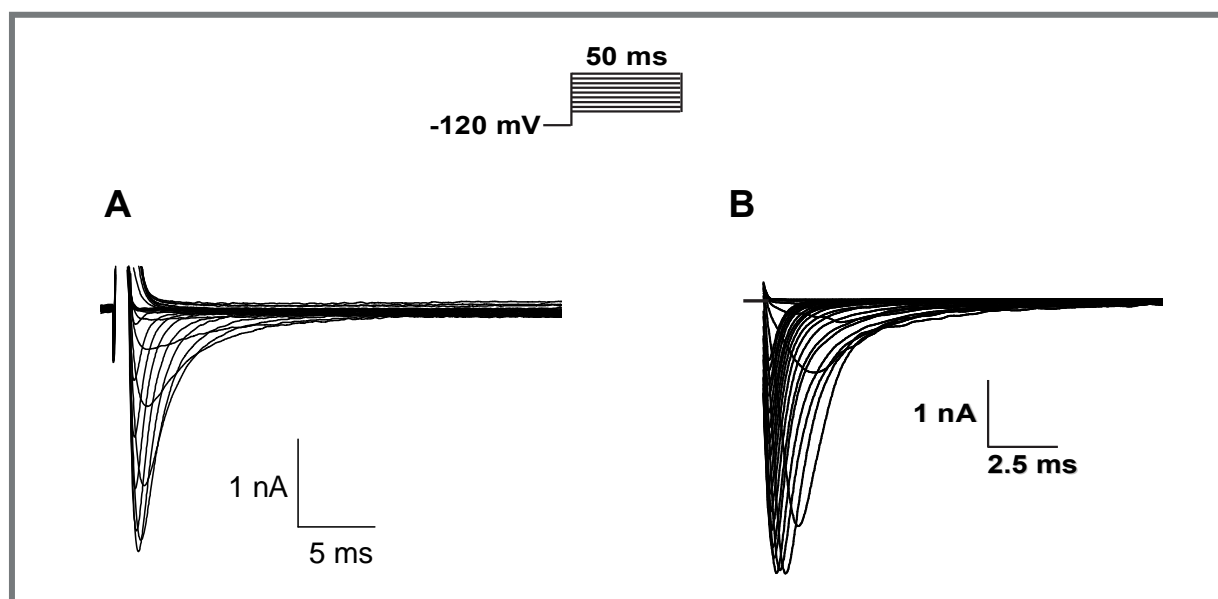
Su implicación en la regulación del canal de  $\text{Na}^+$  cardíaco no está clara todavía, aunque mutaciones en cada una de las cuatro subunidades auxiliares han sido relacionadas con diferentes síndromes arritmogénicos (Abriel, 2010). Además, la presencia de la subunidad  $\text{Nav}\beta 1.1$  disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad  $\alpha \text{Nav}1.5$  (Balsler y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balsler, 2001).

### 2.1.2. Características de la $I_{\text{Na}}$

La  $I_{\text{Na}}$  es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985). La despolarización inicia un cambio conformacional que produce la apertura del canal de  $\text{Na}^+$  (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). La  $I_{\text{Na}}$  alcanza un pico máximo en 0.5-2 ms, y, a continuación, se inactiva de forma rápida (Figura 8). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y b; Armstrong, 1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.

La inactivación de la  $I_{\text{Na}}$  cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balsler, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balsler, 2001; Ulbricht, 2005). Incluso, el canal puede pasar al estado inactivo sin haber pasado por el estado abierto (“inactivación del estado cerrado”) (Horn y cols., 1981). Se ha demostrado que

la “inactivación rápida” depende de tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM” (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994).



**Figura 8. Registros de  $I_{Na}$ .** (A) Trazos de  $I_{Na}$  registrados en nuestro laboratorio en un miocito auricular humano tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -100 y +30 mV desde un potencial de fijación de -120 mV. (B)  $I_{Na}$  registrada en nuestro laboratorio en una célula CHO transfectada de forma transitoria con la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 y la subunidad  $\beta$ 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales desde -80 hasta +70 mV desde un potencial de fijación de -120 mV.

Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de esta inactivación, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004). La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de  $Na^+$  durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balser, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la concentración extracelular de  $Na^+$  (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulada por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O’Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).

### 2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de $Na^+$ cardíacos

La importancia de los canales de  $Na^+$  se pone de manifiesto por la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones en los genes que los codifican, y que afectan a la función nerviosa o a la del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; George, 2005; Zimmer y Surber 2008; Abriel, 2010).

A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad Nav1.5 (SCN5A) se han relacionado con la aparición de arritmias ventriculares (síndrome de QT largo [SQTL], síndrome de Brugada), fibrilación auricular (FA), con defectos en la conducción intracardíaca y/o muerte súbita en recién nacidos (Wang y cols., 1995a; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Schwartz y cols., 2000; Veldkamp y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008; Amin y cols., 2010; Wilde y Brugada, 2011 ).

## 2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, que se activan rápidamente a  $E_m \approx -50$  mV y que se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta  $\approx -30$  mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 ms. Hasta el momento, se han identificado 5 subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con distintas propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas (L, N, P, Q y R). Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y tipo T.

Los canales tipo L se localizan principalmente en los túbulos T de la membrana, próximos y enfrentados a los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L promueve la apertura de los RyR2 con la consiguiente salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo. Es decir, que la  $I_{\text{CaL}}$  provoca la “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ” y con ello dispara la respuesta contráctil de los miocitos cardiacos. A su vez, la  $I_{\text{CaL}}$  determina el  $E_m$  de la fase de meseta del PA. Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células del nodo SA y en las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Yuan y cols., 1996).

2.2.1. Estructura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ 

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ , y, en algunos tejidos, la subunidad  $\gamma$  (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades  $\alpha_1$  (Catterall y cols., 2005b), 4 subunidades  $\beta$ , 4 complejos  $\alpha_2/\delta$  y 8 subunidades  $\gamma$  (Tabla 4), aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) se definen en función de la subunidad  $\alpha_1$  que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  modulan su tráfico a la membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura 9) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005).

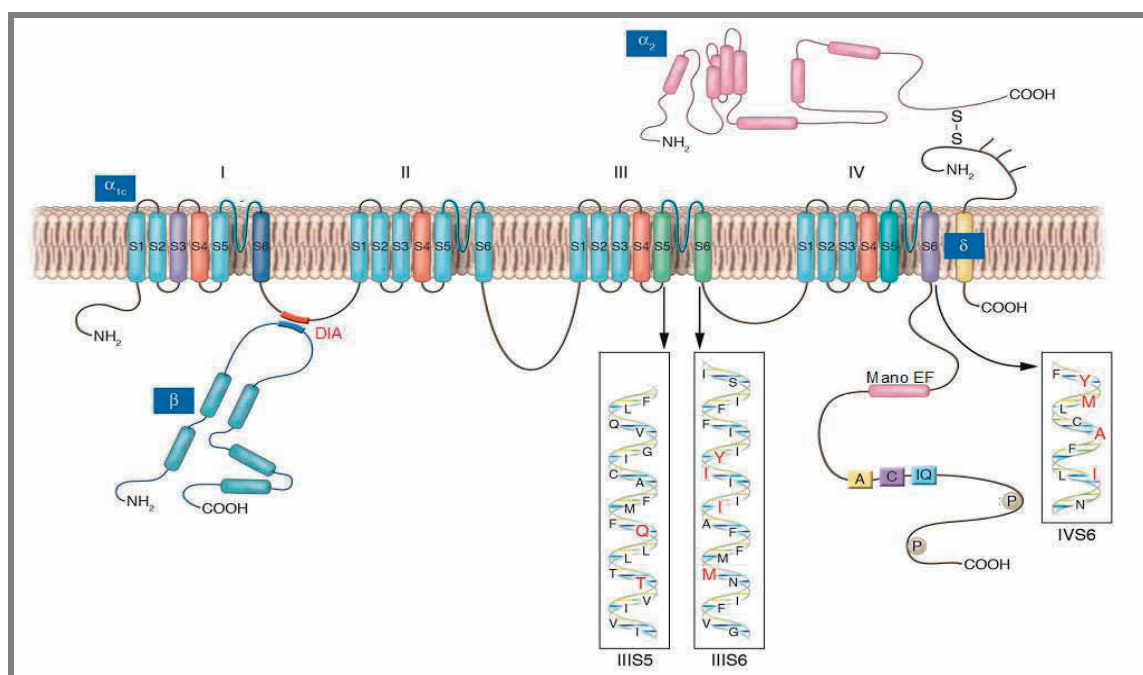


Figura 9. Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

- Subunidad  $\alpha$

La familia Cav1 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). La familia Cav2 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales tipo P/Q, N y R, que se encuentran mayoritariamente en el cerebro, y la familia Cav3 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales tipo T (Tabla 4) (Pérez-Reyes, 2003). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan una gran homología estructural con los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. Las subunidades  $\alpha_1$  presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice (S1 a

S6) (Figura 9). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como en los canales de  $\text{Na}^+$ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P de los cuatro dominios contiene un residuo de Glu (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  que conforma el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

Subunidad $\alpha_1$					Subunidades $\beta$ reguladoras			
	Proteína	Gen	Cromosoma	$I_{\text{Ca}}$	Proteína	Gen	Cromosoma	
Cav $\alpha$ 1	Cav1.1 ( $\alpha_{1S}$ )	CACNA1S	1q31-32	L	Cav $\beta$	$\beta_1$	CACNB1	17q11.2
	Cav1.2* ( $\alpha_{1C}$ )	CACNA1C	12p13.3	L		$\beta_2^*$	CACNB2	10p12
	Cav1.3 ( $\alpha_{1D}$ )	CACNA1D	3p14.3	L		$\beta_3$	CACNB3	12q12
	Cav1.4 ( $\alpha_{1F}$ )	CACNA1F	Xp11.23	L		$\beta_4$	CACNB4	2q23
Cav $\alpha$ 2	Cav2.1 ( $\alpha_{1A}$ )	CACNA1A	19p13	P/Q	Cav $\alpha_2$ / $\delta$	$\alpha_2/\delta_1^*$	CACNA2D1	7q11.2
	Cav2.2 ( $\alpha_{1B}$ )	CACNA1B	9q34	N		$\alpha_2/\delta_2^*$	CACNA2D2	3p14
	Cav2.3* ( $\alpha_{1E}$ )	CACNA1E	1q25-31	R		$\alpha_2/\delta_3$	CACNA2D3	3p13
						$\alpha_2/\delta_4$	CACNA2D4	12p13
Cav $\alpha$ 3	Cav3.1* ( $\alpha_{1G}$ )	CACNA1G	17q21	T	Cav $\gamma$	$\gamma_1$	CACNG1	17q26
	Cav3.2* ( $\alpha_{1H}$ )	CACNA1H	16p13.3	T		$\gamma_2$	CACNG2	22q13
	Cav3.3 ( $\alpha_{1I}$ )	CACNA1I	22q13	T		$\gamma_3$	CACNG3	16p12
						$\gamma_4$	CACNG4	17q26
				$\gamma_5$		CACNG5	17q26	
				$\gamma_6$		CACNG6	19q13.4	
				$\gamma_7$		CACNG7	19q13.4	
				$\gamma_8$		CACNG8	19q13.4	

**Tabla 4. Proteínas que forman los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje humanos.** \* Subunidades que se expresan en el corazón. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

#### • Subunidad $\beta$

Las subunidades  $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades  $\alpha_1$  mediante un dominio de interacción  $\beta$  (DIB) que se une al dominio de interacción  $\alpha$  (DIA) de la subunidad  $\alpha_1$  (Figura 8) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal (Jangsangthong y cols., 2010) e

intervienen en la regulación por pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Otro posible papel de las subunidades  $\beta$  es intervenir en el proceso de “facilitación” de la  $I_{Ca,L}$  (Cens y cols., 1996; Buraei y Yang, 2010). La facilitación produce un aumento de la densidad de corriente y una ralentización de la inactivación tras la fosforilación del canal por la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina (CaMKII) (Sculptoreanu y cols., 1993; Yang y cols., 2003).

- Subunidad  $\alpha_2/\delta$

El complejo  $\alpha_2/\delta$  está formado por la unión de la subunidad extracelular  $\alpha_2$  y la subunidad transmembrana  $\delta$  mediante un puente disulfuro (Figura 9). La función del complejo  $\alpha_2/\delta$  varía según las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio  $\delta$  interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio  $\alpha_2$  es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996).

- Subunidad  $\gamma$

La subunidad  $\gamma$  es una proteína con cuatro dominios TM y extremos N- y C-terminales intracelulares de la que existen al menos 8 isoformas, aunque ninguna de ellas se expresa en tejido cardíaco (Kang y Campbell, 2003).

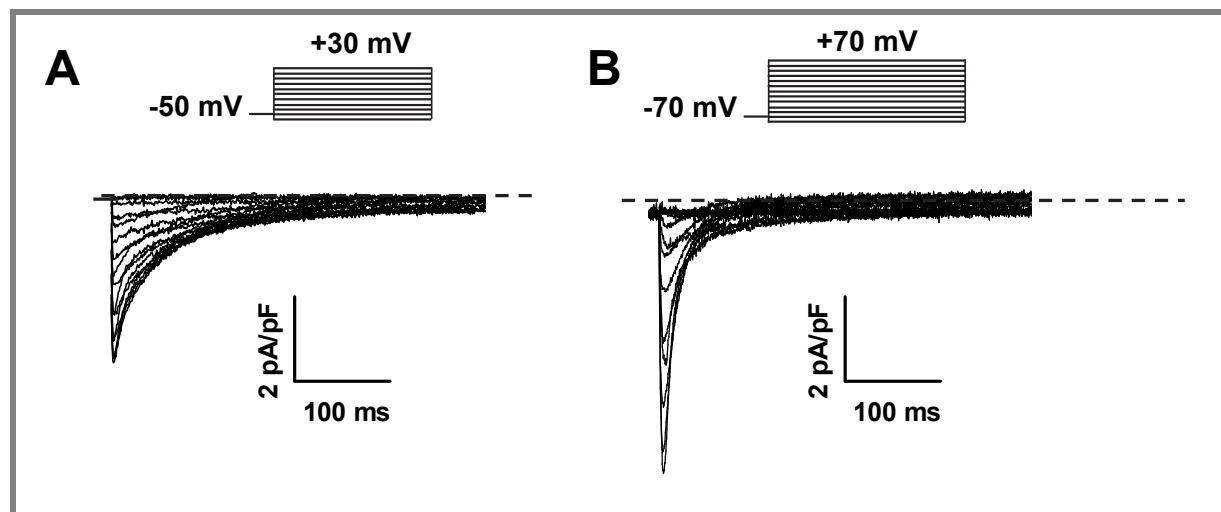
### 2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$

La  $I_{Ca,L}$  registrada en miocitos cardíacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud a potenciales entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 ms (Figura 10).

La inactivación de la corriente es un proceso que depende del voltaje y de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En los canales de  $Ca^{2+}$ , los procesos de inactivación y de recuperación de la inactivación están regulados por cambios estructurales en diferentes partes de la subunidad  $\alpha_1$ , incluyendo el poro, los lazos intracelulares y el extremo C-terminal. Además, se ha comprobado que también participan interacciones con proteínas intracelulares y subunidades auxiliares como la subunidad  $\beta$ . La inactivación debida a altas  $[Ca^{2+}]_i$  representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo



en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura 8) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el  $\text{Ca}^{2+}$  se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación. En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a).



**Figura 10. Registros de  $I_{\text{Ca,L}}$ .** (A)  $I_{\text{Ca,L}}$  registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  registrada en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. La corriente fue registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con las subunidades  $\text{Cav}\alpha_1.2$ ,  $\text{Cav}\beta_2$  y  $\text{Cav}\alpha_2/\delta$ .

### 2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{\text{Ca,L}}$

Los miembros de la familia Cav1 codifican las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma cardíaca específica. Además, en el corazón estos canales presentan dos tipos de subunidades auxiliares, las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$  (Tabla 4). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L es una importante diana farmacológica para el tratamiento de diversas patologías. Los fármacos que inhiben la  $I_{\text{Ca,L}}$  (denominados “antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$ ”) están indicados en el tratamiento de diversas patologías como angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardíacos. Los antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  se dividen estructuralmente en 3 grupos: las DHP (como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el poro del canal (Hering y cols., 1996; Hockerman y cols., 1995; Schuster y cols., 1996; He y cols., 1997; Hockerman y cols., 1997).

#### 2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L

La canalopatía más importante que se ha identificado es la causada por la mutación Gly406Arg en el gen que codifica la subunidad Cav1.2 (CACNA1C), que se ha relacionado con la aparición de síndrome de Timothy (SQTLS) (Splawski y cols., 2004; Bidaud y Lori, 2011). Esta mutación produce un aumento en la amplitud de la  $I_{\text{Ca,L}}$  como consecuencia de la separación de la unión entre las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  y se manifiesta con alteraciones multiorgánicas que afectan al miocardio (prolongación del intervalo QT y arritmias graves e incluso letales), inmunodeficiencia y autismo, debido a la amplia distribución de la subunidad Cav1.2 (Splawski y cols., 2004).

Se han descrito otras mutaciones en los genes que codifican la subunidad  $\alpha$  Cav1.2 (Antzelevitch y cols., 2007), y las subunidades auxiliares Cav $\beta$ 2b (Cordeiro y cols., 2009) y Cav $\alpha_2/\delta_1$  (Burashnikov y cols., 2010) que reducen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la fase de meseta del PA y que se han relacionado con la aparición de síndrome de Brugada y síndrome de repolarización temprana.

### 2.3. Canales de $\text{K}^+$

Los canales de  $\text{K}^+$  constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR celular, el control de la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco (Tabla 5).

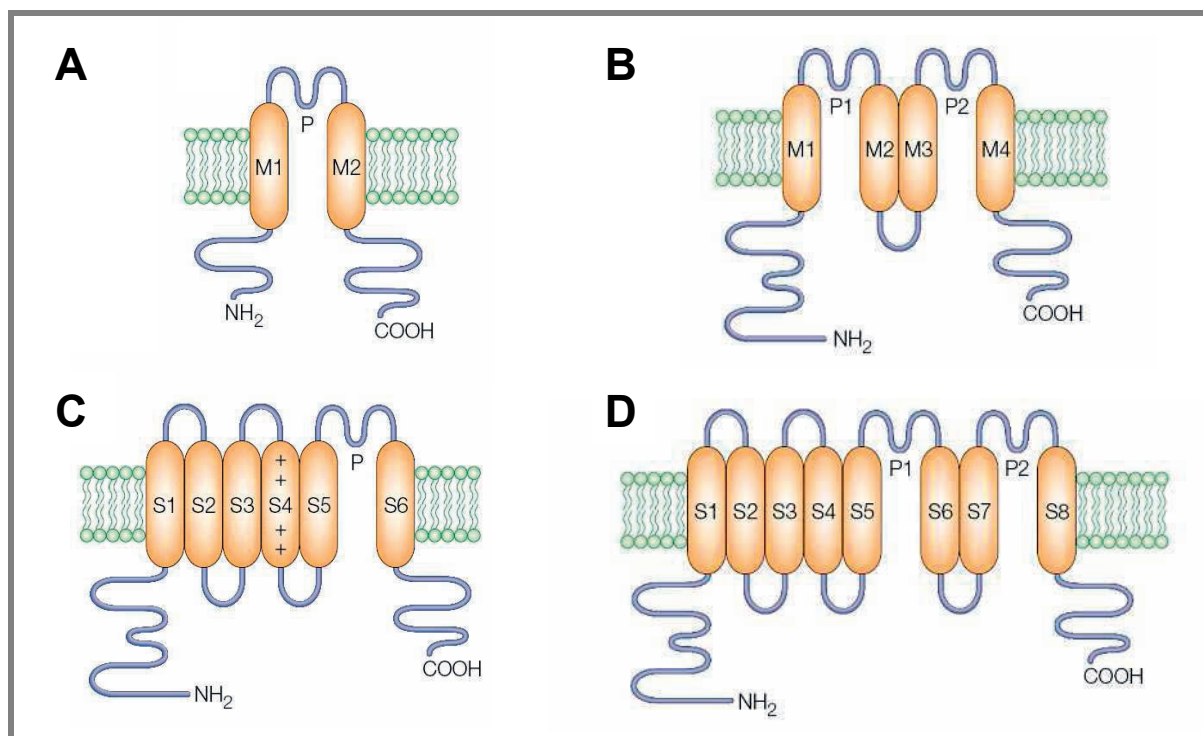
A nivel cardíaco, los canales de  $\text{K}^+$  juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de  $\text{K}^+$  de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la repolarización: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de  $\text{K}^+$  presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los

canales de  $K^+$  determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura 1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de  $K^+$  también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes patologías.

Corriente	Subunidad $\alpha$			Subunidad $\beta$		
	Proteína	Gen	Locus	Proteína	Gen	Locus
$I_{K1}$	Kir2.1 (IRK1)	KCNJ2	17q23.1-24.2			
	Kir2.2 (IRK2)	KCNJ12	17p11.1			
	Kir2.3 (IRK3)	KCNJ4	22q13.10			
$I_{K,ACh}$	Kir3.1 (GIRK1)	KCNJ3	2q24.1			
	Kir3.4 (GIRK4)	KCNJ5	11q24			
$I_{K,ATP}$	Kir6.2 (BIR)	KCNJ11	11p15.1	SUR2A	ABCC9	12p12.1
$K_{2P}$	K <sub>2p</sub> 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42-43			
	K <sub>2p</sub> 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41			
	K <sub>2p</sub> 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24.1-23.3			
	K <sub>2p</sub> 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21			
	K <sub>2p</sub> 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q13-1			
	K <sub>2p</sub> 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24-3			
	K <sub>2p</sub> 10.1 (TREK-1)	KCNK10	14q31			
	K <sub>2p</sub> 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q24.1-24.3			
	K <sub>2p</sub> 17.1 (TASK-4)	KCNK17	6p21.1-2			
$I_{to1}$	Kv4.3	KCND3	11p15.1	KChIP2	KCNIP2	10q25
				DPPX	DPP6	7q36.2-36.3
				MiRP1	KCNE2	21q22.12
				MiRP2	KCNE3	11q13-q14
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Kv $\beta$ 1	KCNAB1	3q25
				Kv $\beta$ 2	KCNAB2	1p36.3
				KChIP1	KCNIP1	5q35
				KChIP2	KCNIP2	10q25
	Kv4.1	KCND1	Xp11.23			
	Kv4.2	KCND2	7q31			
$I_{Kur}$	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Kv $\beta$ 1	KCNAB1	3q25
				Kv $\beta$ 2	KCNAB2	1p36.3
$I_{Ks}$	Kv7.1 (KCNQ1)	KCNQ1	11p15.5	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
$I_{Kr}$	Kv11.1 (hERG)	KCNH2	7q35-36	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
				MiRP1	KCNE2	21q22.1

**Tabla 5. Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales que generan las diferentes corrientes de  $K^+$  cardíacas humanas.** Entre paréntesis, nombre alternativo de algunas de las proteínas. [Adaptada de Tamargo y cols., 2004]

El estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), denominado así por el aleteo constante que se observaba en estas moscas al ser anestesiadas con éter, permitió la clonación y secuenciación del primer canal de  $K^+$  (Jan y cols., 1983). Desde entonces, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar más de 200 genes que codifican canales de  $K^+$  (Coetzee y cols., 1999; Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004; Gutman y cols., 2005; Li y Dong, 2010).



**Figura 11. Topología de la subunidad  $\alpha$  de los cuatro grandes grupos de canales de  $K^+$ .** (A) Canales 2TM/1P. (B) Canales 4TM/2P (C) Canales 6TM/1P (D) Canales 8TM/2P. [Adaptadas de Choe, 2002]

Los canales de  $K^+$  se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (Figura 11):

- Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P). Incluye también a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.
- Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P).
- Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.
- Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P). Este grupo, compuesto por los canales de  $K^+$  con rectificación interna (canales Kir), será tratado con más detalle en el apartado 3.

### 2.3.1. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de  $K^+$  activados por voltaje (canales Kv) y a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (canales  $BK_{Ca}$ ). Tras el clonaje del canal *Shaker* (Jan y cols., 1983) se identificaron otras tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales Kv a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) y Kv4

(*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades  $\alpha$  Kv (Kv1 a Kv12), con una homología aminoacídica de  $\approx 70\%$  dentro de una misma familia y de  $\approx 40\%$  entre diferentes familias (Tabla 6) (Gutman y cols., 2005).

Familia	IUPHAR	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kv1 (<i>Shaker</i>)</b>	Kv1.1	KCNA1	12p13.3	Cerebro, corazón, retina, músculo esquelético, islotes pancreáticos
	Kv1.2	KCNA2	1p13	Cerebro, corazón, retina, músculo liso, islotes pancreáticos
	Kv1.3	KCNA3	1p13.3	Cerebro, pulmones, timo, hígado, nódulos linfáticos, testículos, linfocitos, fibroblastos, osteoclastos, plaquetas, islotes pancreáticos
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Cerebro, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Corazón, músculo liso, pituitaria, colon, riñón, estomago, aorta, arterias pulmonares, hipocampo
	Kv1.6	KCNA6	12p13.3	Cerebro, corazón, pulmones, testículos, músculo liso, arterias pulmonares, ovarios, astrocitos, oligodendrocitos
	Kv1.7	KCNA7	19q13.3	Corazón, músculo liso, placenta, arterias pulmonares
	Kv1.8	KCNA10	1p13.1	Riñón, cerebro, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal
<b>Kv2 (<i>Shab</i>)</b>	Kv2.1	KCNB1	20q13.2	Cerebro, corazón, músculo esquelético, arterias pulmonares, pulmones, retina, cóclea
	Kv2.2	KCNB2	8q13.2	Cerebro, corazón, lengua, neuronas simpáticas, músculo liso
<b>Kv3 (<i>Shaw</i>)</b>	Kv3.1	KCNC1	11p15	Cerebro, pulmones, testículos, músculo esquelético
	Kv3.2	KCNC2	12q14.1	Cerebro, islotes pancreáticos, arterias mesentéricas
	Kv3.3	KCNC3	19q13.3-4	Cerebro, neuronas del SNC, arterias mesentéricas, córnea
	Kv3.4	KCNC4	1p21	Paratiroides, próstata, cerebro, células acinares pancreáticas
<b>Kv4 (<i>Shal</i>)</b>	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	Cerebro, colon, corazón, pulmones, estómago, testículos, hígado, riñón, glándulas tiroideas, páncreas, arterias pulmonares
	Kv4.2	KCND2	7q31	Cerebro, corazón, cóclea
	Kv4.3	KCND3	1p13.3	Corazón, cerebro, músculo liso
<b>Kv5</b>	Kv5.1	KCNF1	2p25	Cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, páncreas
<b>Kv6</b>	Kv6.1	KCNG1	20q13	Cerebro, músculo esquelético, útero, ovarios, riñón, páncreas, piel, hueso, placenta, próstata, testículos
	Kv6.2	KCNG2	18q22-23	Corazón, cerebro
	Kv6.3	KCNG3	2p21	Cerebro, testículos, intestino, glándula adrenal, timo, pituitaria
	Kv6.4	KCNG4	16q24.1	Corazón, hígado, intestino, colon
<b>Kv7 (KvLQT)</b>	Kv7.1	KCNQ1	11p15.5	Corazón, riñón, recto, cóclea, páncreas, pulmones, placenta
	Kv7.2	KCNQ2	20q13.3	Cerebro, pulmones, testículos, corazón, ojo, placenta, intestino
	Kv7.3	KCNQ3	8q24	Cerebro, testículos, retina, colon
	Kv7.4	KCNQ4	1p34	Cóclea, placenta
	Kv7.5	KCNQ5	6q14	Cerebro, músculo esquelético

**Tabla 6. Familias de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje.** [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

<b>Kv8</b>	Kv8.1	KCNV1	8q22.3-24.1	Cerebro, riñón
	Kv8.2	KCNV2	9p24.2	Pulmones, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, colon, ovarios
<b>Kv9</b>	Kv9.1	KCNS1	20q12	Cerebro, melanocitos
	Kv9.2	KCNS2	8q22	Cerebro, retina
	Kv9.3	KCNS3	2p24	Cerebro, colon, corazón, estómago, riñón, pulmones, testículos, piel, útero
<b>Kv10 (eag)</b>	Kv10.1	KCNH1	1q32-41	Cerebro, células tumorales
	Kv10.2	KCNH5	14q23.1	Cerebro
<b>Kv11 (erg)</b>	Kv11.1	KCNH2	7q35-36	Corazón, cerebro, células sanguíneas y tumorales, riñón, pulmón, hígado, ovarios, páncreas, testículos, próstata, intestino, útero
	Kv11.2	KCNH6	17q23.3	Cerebro, útero
	Kv11.3	KCNH7	2q24.2	Cerebro
<b>Kv12 (elk)</b>	Kv12.1	KCNH8	3p24.3	Cerebro, ganglios simpáticos, pulmones, útero, testículos, colon
	Kv12.2	KCNH3	12q13	Cerebro, pulmones
	Kv12.3	KCNH4	17q21.2	Cerebro, cerebelo, esófago, pulmones, glándula pituitaria

**Tabla 6 (Continuación). Familias de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje.** [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc.

### 2.3.1.a. Estructura de los canales Kv

La primera estructura cristalográfica de un canal Kv de mamífero se resolvió en 2005. Era el canal formado por la subunidad  $\alpha$  Kv1.2 y la subunidad auxiliar Kv $\beta$ 2 de cerebro de rata

(Long y cols., 2005a y b), que venía a confirmar los modelos que se habían propuesto anteriormente para los canales Kv tras la resolución de otros canales de  $K^+$  no dependientes de voltaje (Doyle y cols., 1998; Zhou y cols., 2001) y de canales Kv bacterianos (Sokolova y cols., 2001; Jiang y cols., 2003a y b). La estructura resuelta se correspondía con la de un canal tetramérico en estado abierto cuyas dimensiones eran de 135x95x95 Å, con un poro de  $\approx 12$  Å de diámetro (Figura 12).

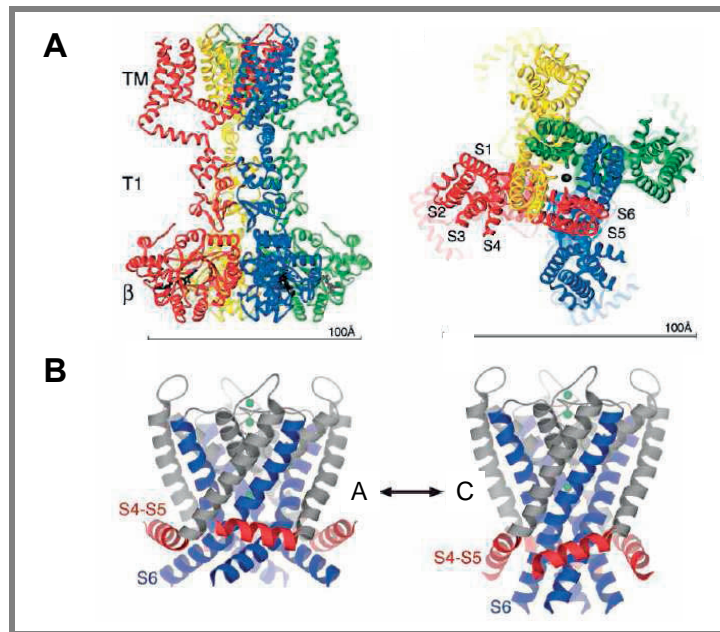
Existen dos patrones fundamentales de organización estructural en la familia de canales Kv: los canales Kv1 a Kv4 presentan una estructura denominada T1 o “dominio NAB” (*N-terminal A and B box*) en el extremo N-terminal que se ha demostrado fundamental para el reconocimiento entre subunidades  $\alpha$  y responsable de la interacción con subunidades  $\beta$  y otras proteínas (Figura 13B), mientras que los canales Kv7, Kv10 y Kv11 no presentan ese dominio T1 (Figura 13C) (Shen y Pfaffinger, 1995; Xu y cols., 1995; Kreusch y cols., 1998; Yellen, 2002).

### *I. La subunidad $\alpha$*

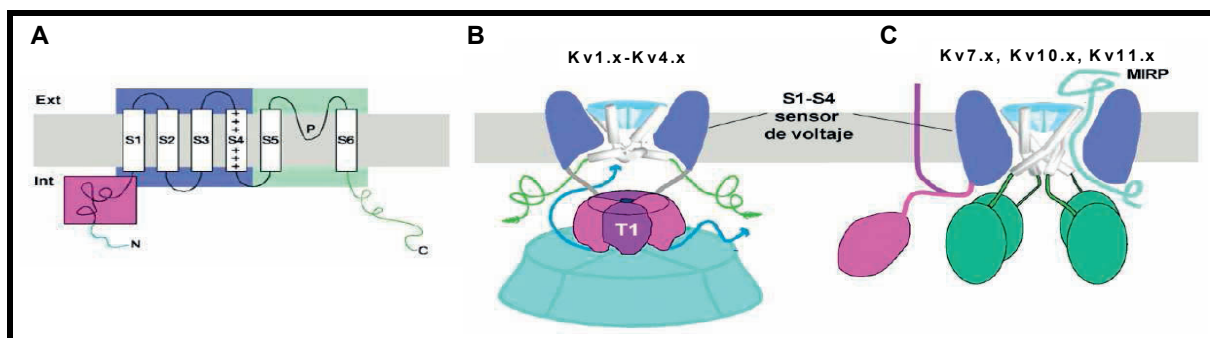
En los canales Kv, cada subunidad  $\alpha$  consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice  $\alpha$  y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras 11C y 12A). Las cuatro subunidades  $\alpha$  que forman el canal se disponen de tal forma que la boca externa del poro está formada por los lazos P de cada subunidad. Los S1 a S4 constituyen el sensor de voltaje mientras el segmento S6 y la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 forman la boca interna del poro (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991).

#### • El poro iónico

El poro iónico de los canales Kv está formado por una región de 20 aminoácidos del lazo P (Doyle y cols., 1998; Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Jiang y cols., 2002a). La región que une los segmentos S5 y S6 es el sitio de unión de muchas toxinas y el segmento de unión de S4-S5 forma parte del receptor para la partícula de inactivación (Isacoff y cols., 1991). Gracias a estudios de mutagénesis dirigida en canales, se ha podido demostrar que en el poro iónico se encuentran los lugares de unión para el tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993), fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Yeola y cols., 1996), o anestésicos locales como la bupivacaína (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997) y la benzocaína (Caballero y cols., 2002).



**Figura 12. Estructura del complejo formado por la subunidad  $\alpha$  Kv1.2 y la subunidad auxiliar  $\beta_2$ .** (A) Vistas lateral (a la izquierda) y desde el lado extracelular (a la derecha) del complejo Kv1.2/Kv $\beta_2$ . (B) Modelo propuesto del canal Kv1.2, donde se observa la diferente posición del lazo S4-S5 en los estados abierto (a la izquierda) y cerrado (a la derecha). [Adaptadas de Long y cols., 2005a (A) y 2005b (B)]



**Figura 13. Estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales Kv.** (A) Esquema de la estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales Kv, donde se observan los 6 segmentos TM y los segmentos N- y C-terminales intracelulares. El recuadro rosa indica la posición del dominio T1. (B y C) Disposición estructural de los dominios intracelulares de los canales Kv1 a Kv4 (B) y de los canales Kv7, Kv10 y Kv11 (C). [Adaptadas de Yellen, 2002]

### • Sensor de voltaje

La principal característica de los canales Kv consiste en que son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). El sensor de voltaje está formado por los cuatro primeros segmentos del canal (S1-S4). El segmento S4 contiene cuatro o más residuos Arg y Lys, cada uno de los cuales separado por dos residuos hidrofóbicos, que se recolocan en la membrana cuando el  $E_m$  varía. Así, la apertura y cierre del canal generan un movimiento del sensor de voltaje de  $\approx 12-13$  cargas elementales a través del campo eléctrico transmembrana (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995), resultando en una corriente de *gating* que puede ser medida experimentalmente (Armstrong y Bezanilla, 1973).



Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados del S4 desplazan el valor del punto medio de la curva de activación del canal, lo que indica que el S4 juega un importante papel en el cambio conformacional que conlleva su apertura (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991).

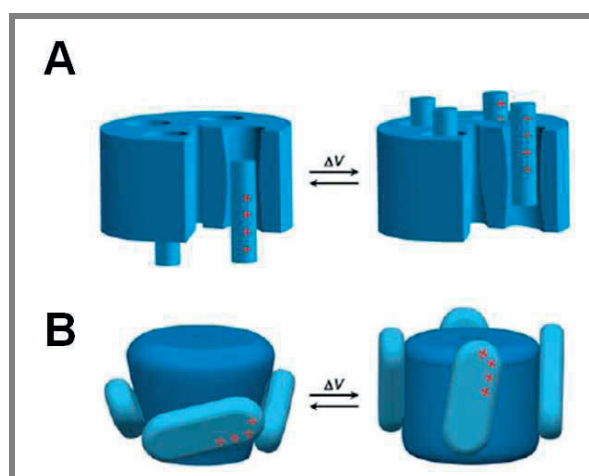
Dos son los principales modelos de movimiento del sensor propuestos: un modelo “de rotación”, con la exposición de determinados residuos del S4 en ranuras acuosas en las que el campo eléctrico está muy confinado (Figura 14A), y un modelo “de inclinación” o “modelo de remo”, que implica grandes desplazamientos del sensor a través del campo transmembrana (Figura 14B) (Jiang y cols., 2003b; Tombola y cols., 2005).

El ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura 15 y Tabla 7) y regula funciones como el *gating*, la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.

## II. Subunidades auxiliares

- Subunidades Kv $\beta$

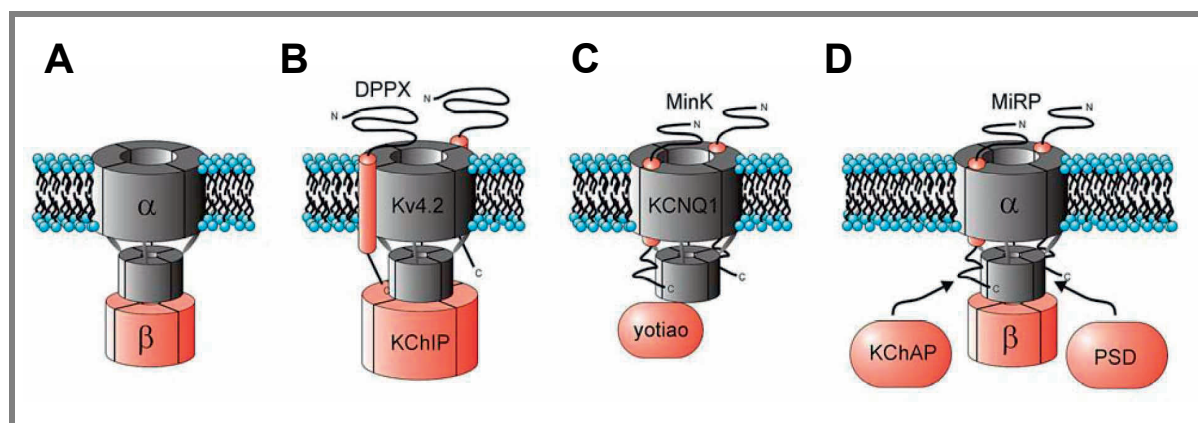
La familia de las subunidades Kv $\beta$  está compuesta por tres proteínas homólogas (Kv $\beta$ 1 a Kv $\beta$ 3), así como varias isoformas de alguna de ellas (Wang y cols., 1996a; Martens y cols., 1999). Similares a las enzimas óxido reductasa, su principal efecto es inducir una rápida inactivación (especialmente las Kv $\beta$ 1).



**Figura 14. Modelos de movimiento del sensor de voltaje.** (A) Modelo convencional en el que el movimiento de cargas se realiza a través del núcleo proteico del canal mediante un movimiento de traslación y/o rotación del S4. (B) Modelo en el que el sensor de voltaje se encuentra sumergido en los lípidos de la membrana, produciendo el desplazamiento de cargas a través del campo eléctrico. [Adaptadas de Jiang y cols., 2003b]

Familia	Subunidad	Gen	Cromosoma
<b>Kv<math>\beta</math></b>	Kv $\beta$ 1*	KCNAB1	3q25
	Kv $\beta$ 2*	KCNAB2	1p36.3
	Kv $\beta$ 3	KCNAB3	17p13
<b>minK y péptidos relacionados (KCNE)</b>	minK*	KCNE1	21q22
	MiRP1*	KCNE2	21q22
	MiRP2*	KCNE3	11q13
	MiRP3	KCNE4	2q36.3
	MiRP4*	KCNE5	Xq22
<b>KChAP</b>	KChAP*	PIAS3	1q12
<b>KChIP</b>	KChIP1	KCNIP1	5q35
	KChIP2*	KCNIP2	10q25
	KChIP3	KCNIP3	2q11.2-11.3
	KChIP4.2	CSEN	2q11.1
	KChIP4.3	KCNIP4	4p15.3
<b>DPP</b>	DPP6*	DPP6	7q36.2-36.3
	DPP10*	DPP10	2q14.1

**Tabla 7. Principales subunidades auxiliares de los canales Kv.** \*Subunidades que se expresan en el miocardio. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]



**Figura 15. Dibujo esquemático de diversas subunidades auxiliares de canales iónicos.** Las subunidades  $\alpha$  aparecen en gris y las subunidades  $\beta$  en rojo. (A) Ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  Kv con 4 subunidades Kv $\beta$  citosólicas a través del extremo N-terminal. (B) Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad  $\alpha$ . (C) Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. (D) Complejo molecular formado por una subunidad  $\alpha$  Kv, las subunidades auxiliares Kv $\beta$ , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

- Subunidad minK y péptidos relacionados

La presencia en el corazón de la proteína minK (*minimal K<sup>+</sup> channel subunit*) es predominantemente ventricular (Folander y cols., 1990) y por su asociación con la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 genera la  $I_{Ks}$  (Figura 15C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) a las siguientes subunidades auxiliares

homologas a minK, codificadas por genes KCNE (Figura 15D) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004). Se ha demostrado la presencia de MiRP1, MiRP2 y MiRP3 en tejido miocárdico humano, donde podrían ensamblarse con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1, Kv7.1, Kv4.2 y Kv4.3 (Abbott y cols., 1999; Finley y cols., 2002; McCrossan y Abbott, 2004; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008a).

- Subunidad KChAP

La subunidad KChAP (*K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*) pertenece a la familia de proteínas inhibidoras del STAT activado (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002). Puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura 15D) (Wible y cols., 1998; Kuryshv y cols., 2000b).

- Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas relacionadas con la familia de sensores neuronales de  $Ca^{2+}$ . Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  del canal afectando a la cinética de inactivación y/o a la cinética de recuperación de la inactivación (Figura 15C) (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007). KChIP2a, KChIP2b y KChIP2c se unen a las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 para regular su expresión en membrana y modular las propiedades cinéticas de la  $I_{to1}$  (An y cols., 2000).

- Subunidades DPPX

Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de las serín-proteasas no clásicas y son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Figura 15B) (Wada y cols., 1992). Se ha sugerido que tienen como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003). Se ha sugerido su asociación con KChIP y la subunidad  $\alpha$  Kv4 para generar la  $I_{to1}$  en el miocardio (Radicke y cols., 2005).

### 2.3.1.b. La inactivación de los canales Kv

El estado inactivo es un estado no conductor que la mayoría de los canales Kv alcanzan tras su activación, aunque puede alcanzarse desde el estado cerrado o sin que el canal se abra (Rasmusson y cols., 1998; Kurata y Fedida, 2006). Tanto la inactivación como la recuperación de la misma son fundamentales para determinar la contribución de cada una de las corrientes de  $K^+$  a la repolarización cardíaca. Sin embargo, no existe un único mecanismo responsable de la inactivación, sino que es un proceso que presenta propiedades diferentes dependiendo del canal estudiado.

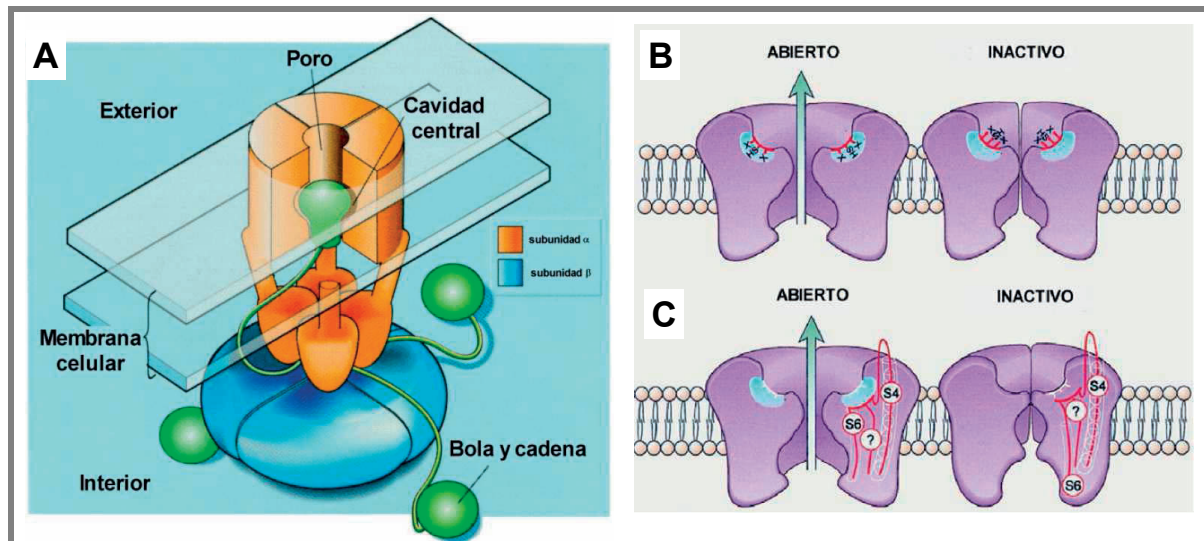
La **inactivación tipo-N** se conoce como “modelo de la bola y la cadena”, ya que una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N-terminal (bola), que se encuentra unida al canal a través del dominio formado por el resto de aminoácidos hasta el segmento S1 (cadena), ocluye el poro intracelular del canal e impide el paso de los iones (Figura 16A) (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Lee y cols., 1996). Este mecanismo es un proceso de inactivación muy rápido (1-10 ms), por lo que también se conoce como “inactivación rápida” y se produce en canales de la familia *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4), *Shal* (Kv4.2 y Kv4.3) y *Shaw* (Kv3.1-3.4) (Coetzee y cols., 1999).

La eliminación de la inactivación rápida tipo-N dejó en evidencia la presencia de un proceso inactivante lento al que se denominó **inactivación tipo-C** (Figuras 16B y C) (Choi y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991) que depende de cambios conformacionales en la boca externa del poro que implican también la participación del filtro de selectividad (López-Barneo y cols., 1993; Rasmusson y cols., 1998). La inactivación tipo-C se diferencia de la tipo-N en que es un mecanismo en el que las cuatro subunidades del canal actúan de manera cooperativa, mientras que los dominios inactivantes tipo-N actúan independientemente (Ogielska y cols., 1995; Panyi y cols., 1995).

La inactivación tipo-C, al igual que la inactivación tipo-N, es independiente de voltaje a potenciales a los que la activación es completa, lo que sugiere que están acopladas a la activación. (Hoshi y cols., 1990; Rasmusson y cols., 1995). Además, la recuperación de ambos tipos de inactivación es voltaje dependiente, debido al descenso del segmento S4 (Rasmusson y cols., 1995) de manera similar al mecanismo propuesto para el modelo de “bola y cadena” (Rasmusson y cols., 1995).

Sin embargo, la inactivación tipo-C se puede diferenciar fácilmente de la tipo-N ya que no es sensible a la perfusión intracelular con TEA (Hoshi y cols., 1991; López-Barneo y cols.,

1993) y es sensible a la concentración y naturaleza del catión permeable en el medio extracelular (MacKinnon y Yellen, 1990).



**Figura 16. Modelos de inactivación de los canales Kv.** (A) Modelo de “la bola y la cadena”. (B-C) Modelo de inactivación tipo-C: cambios conformacionales en la boca externa del poro asociados a la inactivación tipo-C (B) y cambios conformacionales adicionales que tienen lugar durante este tipo de inactivación (C), asociados fundamentalmente al S6. [Adaptadas de Aldrich, 2001 (A) y Rasmusson y cols., 1998 (B-C)]

### 2.3.1.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han identificado al menos 4 corrientes de  $K^+$  generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardíaco: la  $I_{to1}$ , la  $I_{Kur}$ , la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Ks}$ .

#### 1. La $I_{to}$

La corriente transitoria de salida de  $K^+$  fue descrita por primera vez en fibras de Purkinje de oveja, donde su actividad era evidente en la primera fase de repolarización del PA (Dudel, 1967; Fozzard 1973). Al principio se pensó que era una corriente debida a la entrada de  $Cl^-$ , aunque más tarde se describió que está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la  $I_{to1}$  y la  $I_{to2}$ , donde sólo la  $I_{to1}$  es una corriente de  $K^+$ , sensible a 4-aminopiridina (4-AP) e independiente de  $Ca^{2+}$ , mientras que la  $I_{to2}$  es una corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  y de menor magnitud que la  $I_{to1}$  (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). La  $I_{to1}$  es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura

y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

### *I.a. Características de la $I_{to1}$*

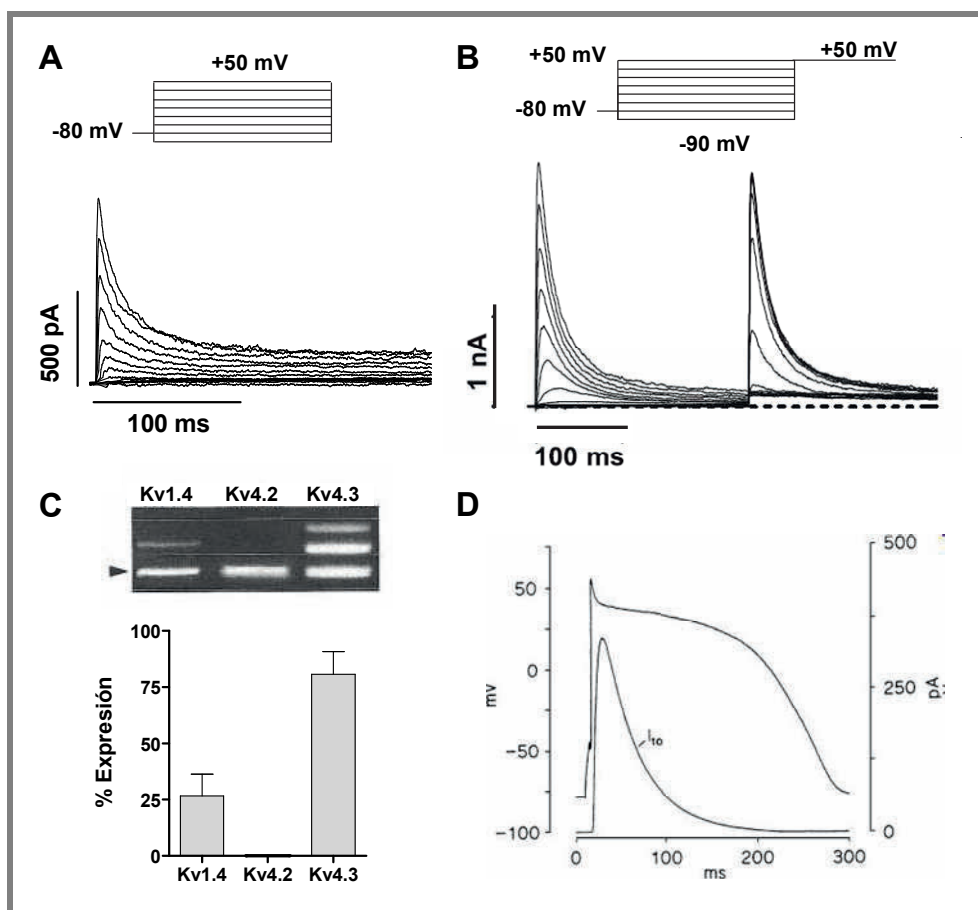
La  $I_{to1}$  se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 ms) e inactiva muy rápidamente en respuesta a una despolarización (Figura 17), siendo su reactivación también muy rápida ( $\approx 50$  ms) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992).

La amplitud de la  $I_{to1}$  es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en el control de la DPA es más importante a frecuencias cardíacas lentas. Además, en las células en las que coexiste con las corrientes de  $K^+$  rectificadoras tardías, la inhibición de la  $I_{to1}$  desplaza la fase 2 del PA hacia valores más positivos, lo que acelera la inactivación de la  $I_{Ca,L}$  y la activación de las corrientes de salida de  $K^+$ , dando como resultado un acortamiento de la DPA (Fermini y cols., 1992; Carmeliet, 1993; Courtemanche y cols., 1999; Burashnikov y cols., 2004).

### *I.b. Composición de los canales que generan la $I_{to1}$*

Existen dos fenotipos de corriente transitoria: una  $I_{to1}$  lenta ( $I_{to1,s}$ ) y una  $I_{to1}$  rápida ( $I_{to1,f}$ ). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Tabla 10) (Nerbonne y Kass, 2005). Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos según la región del miocardio que se estudia: la  $I_{to1,s}$  se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la  $I_{to1,f}$  se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010). Se han identificado tres subunidades  $\alpha$  como posibles responsables de los diferentes fenotipos de la  $I_{to1}$  (Kv1.4, Kv4.2 y Kv4.3), aunque las diferencias observadas entre la corriente generada por cada una de estas subunidades  $\alpha$  y las corrientes nativas sugieren la participación adicional de una o varias subunidades auxiliares (Tabla 10).

En el corazón humano, las subunidades  $\alpha$  Kv4.3 son las responsables de la  $I_{to1,f}$  (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). En el ventrículo humano existen dos variantes de este canal: una isoforma larga o Kv4.3-L y una isoforma corta o Kv4.3-S (Kong y cols., 1998).



**Figura 17. Características de la  $I_{to1}$ .** (A)  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Corriente generada por canales Kv4.3-KChIP2a registrada en células CHO en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (C) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la  $I_{to1}$  auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (D) Representación teórica del comportamiento de la  $I_{to1}$  durante el PA ventricular [*Adaptadas de Caballero y cols., 2004 (B), Bertaso y cols., 2002 (C), Patel y Campbell, 2005 (D)*]

$I_{to}$	Canal	$\tau_{Act}$ (ms)	$\tau_{Inact}$ (ms)	$\tau_{Rec}$ (ms)	Tejido	Acción 4-AP	Especie
$I_{to1,s}$	Kv1.4	2-10	80-200	1000-2000	V	Abierto	Cj, H, Hr, R, Rta
$I_{to1,f}$	Kv4.3 Kv4.2	2-10	25-80	25-80	A, V, Purk	Cerrado	G, H, Hr, P, R, Rta

**Tabla 10. Principales características de las corrientes  $I_{to1,f}$  e  $I_{to1,s}$ .** A: Aurícula. Act: Activación. Cj: Conejo. G: Gato. H: Hombre. Hr: Hurón. Inact: Inactivación. P: Perro. Purk: Purkinje. R: Ratón. Rec: Recuperación de la inactivación. Rta: Rata. V: Ventrículo. [*Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005*]

La secuencia del canal Kv4.3 está altamente conservada (la isoforma humana sólo presenta tres aminoácidos diferentes al de rata) (Dilks y cols., 1999). La dependencia de voltaje de las variantes de hKv4.3 expresadas en células CHO se asemeja a las de la  $I_{to1,f}$  registrada en miocitos ventriculares humanos (Figura 18) (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Näbauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996). El rango

de voltaje de activación y las características de la inactivación de esta corriente son similares en las corrientes nativas y en los canales clonados, apareciendo a potenciales más positivos de -40 mV y con un punto medio de activación de 10 mV. (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Näbauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996; Kong y cols., 1998).

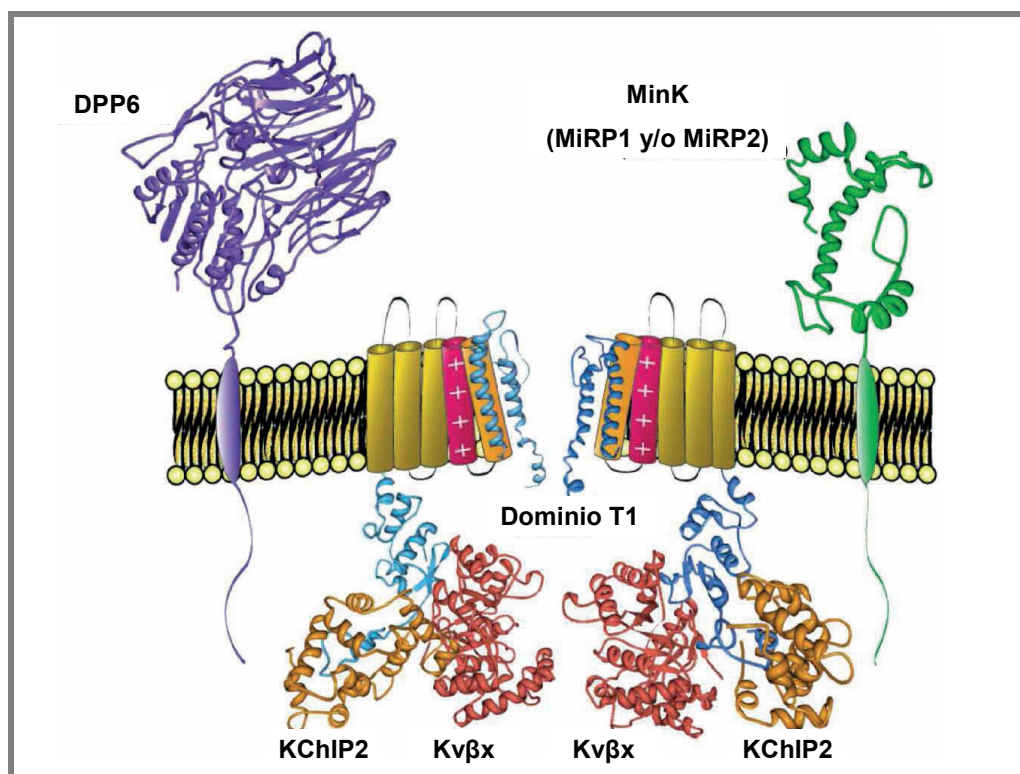
- Subunidad reguladoras

Las primeras subunidades auxiliares que se relacionaron con la modulación de la  $I_{\text{tot},f}$  fueron las subunidades KChIP, concretamente la KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001). La coexpresión de las proteínas KChIP con canales Kv4.x incrementa de forma muy marcada la expresión de dichos canales en la membrana de la célula, lo que funcionalmente se puede observar como un aumento en la amplitud/densidad del pico de corriente sin modificar la conductancia del canal único (Bähring y cols., 2001). Además, la proteína KChIP retrasa la inactivación de la corriente y acelera la recuperación de la inactivación, pero tiene un efecto mínimo sobre la cinética y la dependencia de voltaje de la activación de los canales Kv4.x (Bähring y cols., 2001). Se ha propuesto que cada subunidad KChIP podría unirse lateralmente con dos dominios T1 del extremo N-terminal de cada subunidad Kv4.3 (Pioletti y cols., 2006; Wang y cols., 2007).

Las proteínas minK y MiRP modulan las propiedades cinéticas y dependientes de voltaje también cuando se coexpresan en sistemas heterólogos con los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Figura 17) (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006 y 2008; Delpón y cols., 2008a; Liu y cols., 2008). En miocitos auriculares humanos se ha descrito que MiRP2 coimmunoprecipita con los canales Kv4.3 en experimentos realizados (Delpón y cols., 2008). Además, se ha observado que subunidad MiRP2 disminuye la densidad de la corriente Kv4.3 coexpresado o no con la subunidad KChIP2 (Jiang y cols., 2004; Lundby y Olesen, 2006; Delpón y cols., 2008a). Se ha descrito una mutación que revierte los efectos inhibitorios de esta proteína sobre los canales Kv4.3, incrementando de la corriente generada por estos canales (Delpón y cols., 2008a).

Las glicoproteínas DPP6 y DPP10 regulan y se coexpresan con los canales Kv4.2 y Kv4.3 en neuronas (Figura 18) (Nadal y cols., 2003; Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006) y su presencia en el miocardio humano sugiere también su posible participación en la  $I_{\text{tot},f}$  (Radicke y cols., 2005 y 2007).





**Figura 18.** Dibujo esquemático del canal Kv4.3 con sus posibles subunidades auxiliares. [Adaptada de Niwa y Nerbonne, 2010]

Por último, las subunidades  $Kv\beta_1$ ,  $Kv\beta_2$ ,  $Kv\beta_3$ , KChAP y  $Nav\beta_1$  también son capaces de modular los canales Kv4.2 y Kv4.3 *in vitro* (Figura 17) (Wible y cols., 1998; Pérez-García y cols., 1999; Kuryshev y cols., 2000; Yang y cols., 2001), aumentando la expresión de los canales Kv4.3 sin alterar sus propiedades cinéticas (Yang y cols., 2001), o produciendo un aumento en la densidad del pico de la corriente, una aceleración de la inactivación y un retraso en la recuperación de la inactivación (Deschênes y Tomaselli, 2002; Deschênes y cols., 2008).

### *I.c. La $I_{to1}$ en diversas patologías*

En situaciones como la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia cardíaca, la isquemia miocárdica y el infarto de miocardio se produce una prolongación de la DPA (Kääb y cols., 1998; Tomaselli y Marbán, 1999; Oudit y cols., 2001). En la hipertrofia cardíaca, esta prolongación se correlaciona con una disminución de la  $I_{to1}$  y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 (Potreau y cols., 1995; Meszaros y cols., 1996; Nattel y cols., 2010). También se ha descrito una disminución de la  $I_{to1}$  y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 tras infarto de miocardio (Kaprielian y cols., 1999; Huang y cols., 2000).

De igual forma, tanto la  $I_{to1}$  como la expresión de Kv4.3 se encuentran significativamente disminuidas en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Grammer y cols., 2000; Workman y cols., 2001; Michael y cols., 2009; Nattel y cols., 2010, Caballero y cols., 2010).

De forma teórica se había postulado que el Síndrome de Brugada podría ser consecuencia de una disminución de las corrientes despolarizantes ( $I_{Na}$  e  $I_{CaL}$ ) o de un aumento de las repolarizantes ( $I_{to1}$ ) que actúan durante la fase de meseta del PA (Di Diego y cols., 2002). Recientemente se ha identificado la primera mutación en KCND3 que produce un aumento de función implicada en la aparición de Síndrome de Brugada. Esta mutación produce un aumento en la densidad del pico de la  $I_{to1}$  en el ventrículo izquierdo precisamente donde la expresión de KCND3 es mayor (Giudicessi y cols., 2011).

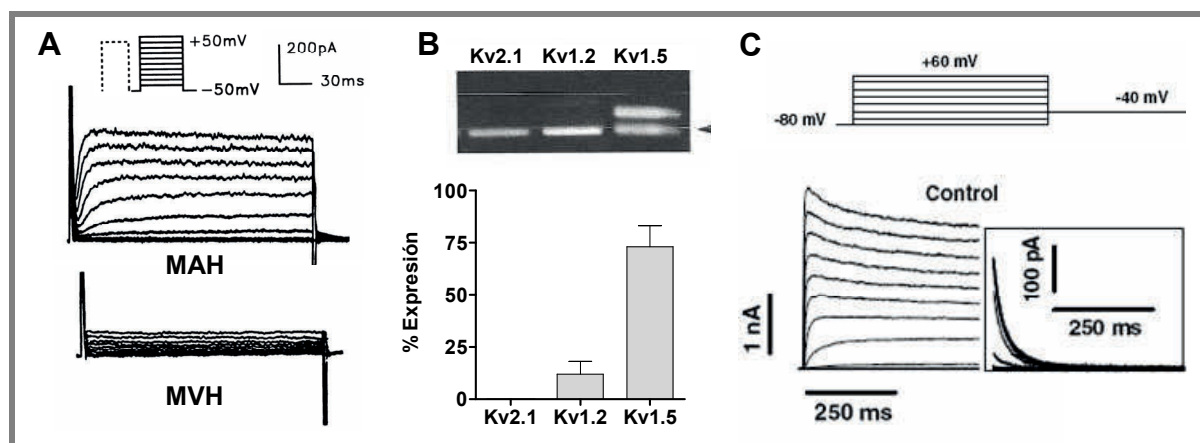
## II. La $I_{Kur}$

Las células auriculares presentan una corriente de salida de  $K^+$  denominada  $I_{Kur}$  que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993a; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia en el tejido auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009; Barana y cols., 2010).

### II.a. Características de la $I_{Kur}$

La  $I_{Kur}$  se activa rápidamente ( $<10$  ms) y presenta una inactivación parcial o incluso no se inactiva en absoluto durante el curso temporal del PA (Figura 19A) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993a; Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004). La recuperación de la inactivación también es un proceso muy lento, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y b).

En humanos, la  $I_{Kur}$  se ha registrado en el tejido auricular, pero no en el ventricular (Figura 20A) (Wang y cols., 1993a; Li y cols., 1996b), por lo que se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).



**Figura 19. Características de la  $I_{Kur}$ .** (A)  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la  $I_{Kur}$  no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo  $I_{Kur}$  en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

### II.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kur}$

Existen diversas subunidades  $\alpha$  Kv que generan corrientes similares a la  $I_{Kur}$  (Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1), que difieren en sus propiedades farmacológicas (Tabla 11). La sensibilidad a 4-AP y la resistencia al TEA y a la dendrotoxina (DTX) de la  $I_{Kur}$  humana y de ratón parecen indicar que es la subunidad  $\alpha$  Kv1.5 la responsable de generar esta corriente en ambas especies (Nattel y cols., 1999).

Subunidad $\alpha$	Gen	4-AP ( $\mu$ M)	TEA (mM)	DTX (nM)	CTX (nM)
Kv1.2	KCNA2	200-800	10-560	1-17	14
Kv1.5	KCNA5	50-250	330	>200	>100
Kv2.1	KCNB1	500	6-10		
Kv3.1	KCNC1	29	0.1-0.2	>1000	>1000

**Tabla 11. Propiedades farmacológicas de los distintos canales Kv responsables de la  $I_{Kur}$ .** 4-AP: 4-Aminopiridina. CTX: Caribdotoxina. DTX: Dendrotoxina. TEA: Tetraetilamonio. [Adaptada de Nattel y cols., 1999]

La expresión de canales Kv1.5 humanos en sistemas heterólogos permite registrar una corriente rectificadora tardía que presenta las características biofísicas y farmacológicas de la  $I_{Kur}$ . Aunque la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, sólo forma canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993; Wang y cols., 1993a; Li y cols., 1996b). Además, en miocitos auriculares humanos cultivados en los que se

usan oligonucleótidos antisentido contra el ARNm de la subunidad Kv1.5 no se registra la  $I_{Kur}$  (Feng y cols., 1997b), confirmando el papel de Kv1.5 en la corriente nativa.

Se ha descrito que las subunidades  $\alpha$  de la familia Kv1 se pueden asociar con miembros de la familia de subunidades Kv $\beta$  (England y cols., 1995; Accili y cols., 1997; Martens y cols., 1999), siendo las subunidades Kv $\beta$ 1 y Kv $\beta$ 2 las que se expresan en el miocardio humano (McCormack y cols., 1999). Cuando se coexpresan con Kv1.5, las subunidades Kv $\beta$ 1 participan en la regulación del canal proporcionando sitios de interacción para quinasas (PKA, PKC) (Kwak y cols., 1999) y modificando la inhibición producida por diferentes fármacos como la quinidina o la bupivacaína (González y cols., 2002). Por su parte, la asociación de la subunidad Kv $\beta$ 2.1 con canales Kv1.5 disminuye la expresión en la membrana, aumenta el grado de la inactivación lenta y desplaza el punto medio de la curva de activación hacia potenciales más negativos (Uebele y cols., 1996; Accili y cols., 1997).

### *II.c. La $I_{Kur}$ en diversas patologías*

En ratas, tras infarto de miocardio, la expresión del gen Kv2.1 disminuye con los correspondientes cambios en la corriente (Qin y cols., 1996).

Se ha identificado un polimorfismo en la región C-terminal del canal (Pro532Leu) que aparece con una frecuencia de 1.1% en la población afroamericana (Drolet y cols., 2005; Simard y cols., 2005). En estos individuos la  $I_{Kur}$  generada es prácticamente idéntica a la nativa, sin embargo presenta una sensibilidad menor a fármacos antiarrítmicos como quinidina y propafenona (Simard y cols., 2005). También se ha descrito una mutación (Glu375X) en el gen KCNE5 que produce una pérdida de función del canal Kv1.5 y que se relaciona con la aparición de FA familiar (Olson y cols., 2006).

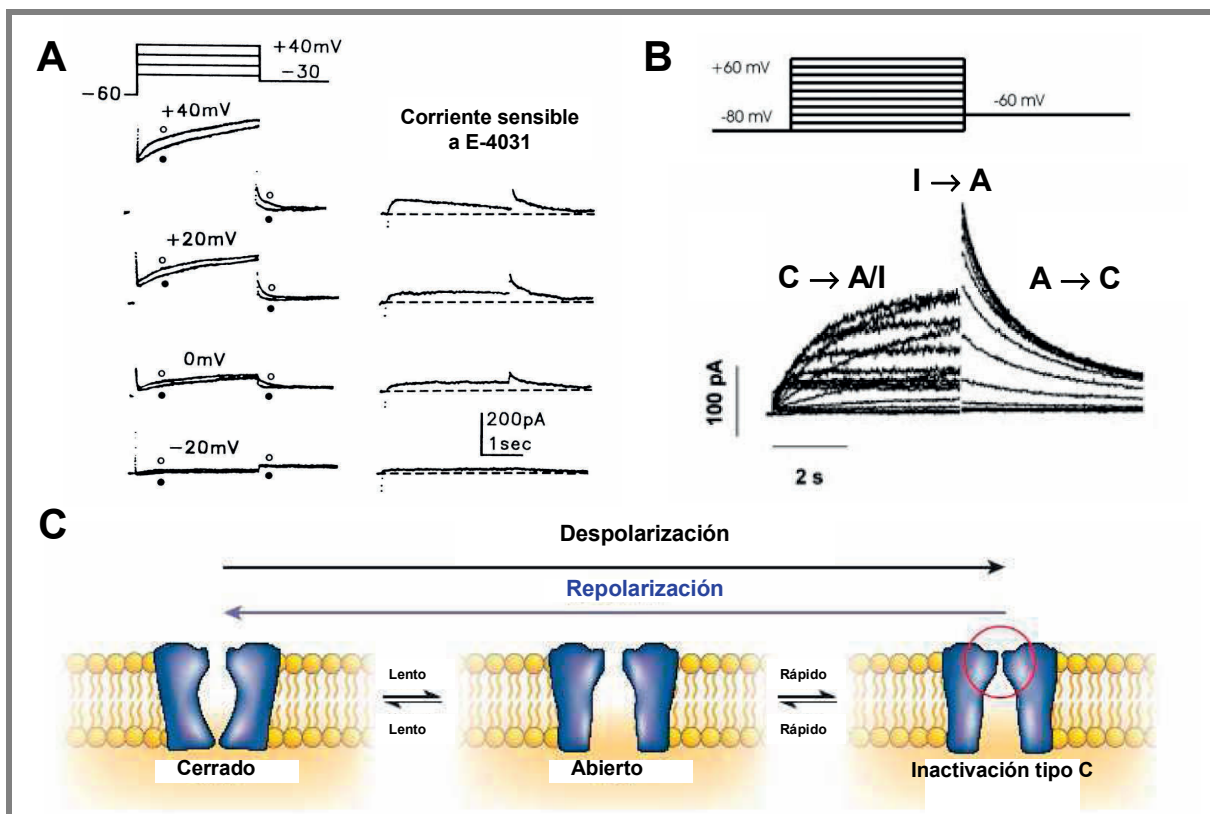
### *III. La $I_{Kr}$*

El componente rápido de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004, Sanguinetti, 2010). La importancia de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad  $\alpha$  (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades  $\beta$  (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como SQT1 o SQT2 (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del

riesgo de sufrir arritmias. Además, la  $I_{Kr}$  es la diana terapéutica de los fármacos antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).

### III.a. Características de la $I_{Kr}$

La amplitud de la  $I_{Kr}$  va aumentando progresivamente con la despolarización del  $E_m$  hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura 20) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de  $E_m$  negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la  $I_{Kr}$  se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura 20) (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001).



**Figura 20. Características de la  $I_{Kr}$ .** (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior izquierda y corriente sensible al E-4031 correspondiente a la  $I_{Kr}$ , (derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

Por todo ello, el grado de activación de la  $I_{Kr}$  durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la  $I_{Kr}$  son especie-específicas. Así, la densidad de la  $I_{Kr}$  en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004).

### *III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$*

La subunidad  $\alpha$  Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) es la responsable de la generación de la  $I_{Kr}$  (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991). Además de en el miocardio, esta subunidad se expresa en SN, músculo liso y células tumorales (Curran y cols., 1995; Tseng, 2001). La subunidad Kv11.1 presenta, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000), y se piensa que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Sin embargo, la  $I_{Kr}$  nativa y la corriente generada por los canales Kv11.1 ( $I_{Kv11.1}$ ) expresados en sistemas heterólogos se diferencian en el *gating* y la conductancia del canal, así como en la regulación por la  $[K^+]_e$  (Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003), sugiriendo la participación de subunidades auxiliares en la generación de esta corriente.

La utilización de oligonucleótidos antisentido contra el ARNm de minK producía una disminución en la amplitud de la  $I_{Kr}$  en células AT-1, una línea tumoral de miocitos auriculares, lo que sugiere la implicación de esta subunidad en la formación de los canales que generan esta corriente (Yang y cols., 1995b). De hecho, la amplitud de la  $I_{Kr}$  era significativamente menor en los cardiomiocitos de ratones minK<sup>-/-</sup> que en los de ratones control. Además, la posterior coexpresión de minK en dichos miocitos producía el aumento de la  $I_{Kr}$  (Kupersmidt y cols., 1999). La coexpresión de minK también aumentaba la amplitud de la  $I_{Kv11.1}$  en células HEK293 (*Human embryonic kidney cells*) (McDonald y cols., 1997).

Por otro lado, las subunidades Kv11.1 y MiRP1 son capaces de formar complejos estables *in vitro* (Abbott y cols., 1999; Cui y cols., 2000). MiRP1 se expresa en fibras de Purkinje y

células del nodo del seno, mientras que a nivel auricular y ventricular su expresión es muy baja (Lundquist y cols., 2005), por lo que se ha sugerido que sólo interacciona con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1 en el sistema de conducción (Weerapura y cols., 2002). La importancia de MiRP1 en la generación de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto tras la descripción de mutaciones en el gen que codifica esta proteína, ya que producen la disminución de la  $I_{Kr}$  y se relacionan con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

### *III.c. La $I_{Kr}$ en diversas patologías*

En un modelo canino de infarto, la densidad de la  $I_{Kr}$  y los niveles de ARNm de Kv11.1 se encuentran reducidos en miocitos ventriculares (Jiang y cols., 2000). Sin embargo, 48 horas después del infarto, la densidad de la  $I_{Kr}$  aumenta en las células de Purkinje subendocárdicas, generando un gradiente en la repolarización ventricular. Esta heterogeneidad en la repolarización puede aumentar los efectos proarrítmicos de ciertos fármacos en pacientes con infarto de miocardio. Además, tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia inhiben la corriente generada por canales Kv11.1 y pueden causar prolongación del QT y arritmias ventriculares, ya que el ATP proveniente de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa es crítico para la función de estos canales (Zhang y cols., 2003).

### *III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1*

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv11.1 y MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT6 y de SQT7.

Se conocen más de 200 mutaciones en el gen que codifica la subunidad Kv11.1 (KCNH2) asociadas al SQT6 (SQT6). El SQT6 representa un 30-35% de los casos de SQT6 y es el que mayor mortalidad presenta (Roberts, 2006). Todas las mutaciones identificadas producen una disminución de la  $I_{Kr}$  ocasionada por la pérdida/disminución en la función del canal Kv11.1 (Curran y cols., 1995; Zhou y cols., 1998; Splawski y cols., 2000; Tseng, 2001; Rajamani y cols., 2002; Kass y Moss, 2003; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006; Sanguinetti, 2010; Amorós y cols., 2011).

También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 (KCNE2) asociadas a la aparición del SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

La inhibición farmacológica de la  $I_{Kr}$  está relacionada con la aparición de un tipo de SQTLC que se denomina “SQTLC adquirido” (De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Esta disminución de la  $I_{Kr}$  debida a fármacos está relacionada tanto con el bloqueo de los canales Kv11.1 que la generan (Mitcheson y cols., 2000), como con la inhibición del transporte a membrana de los mismos (Dennis y cols., 2007). En ambos casos, se produce un aumento de la DPA ventricular que prolonga el intervalo QT y el periodo refractario y favorece el desarrollo de pospotenciales tempranos (Sanguinetti y cols., 1996a; De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Además, la prolongación de la DPA es mayor en las células M que en el tejido subepicárdico y subendocárdico del ventrículo, lo aumenta la dispersión de la repolarización ventricular (Haverkamp y cols., 2000; Tseng, 2001; Redfern y cols., 2003).

Por último, existen mutaciones en el gen KCNH2 relacionadas con la aparición del SQTLC tipo 1 (SQTLC1) (Brugada y cols., 2004). El SQTLC se caracteriza por un acortamiento del intervalo QT del ECG (<360 ms) y una marcada aceleración de la repolarización lo que predispone a padecer FA, FV y/o muerte súbita (Gussak y cols., 2000; Brugada y cols., 2004; Bjerregaard y Gussak, 2005).

#### *IV. La $I_{Ks}$*

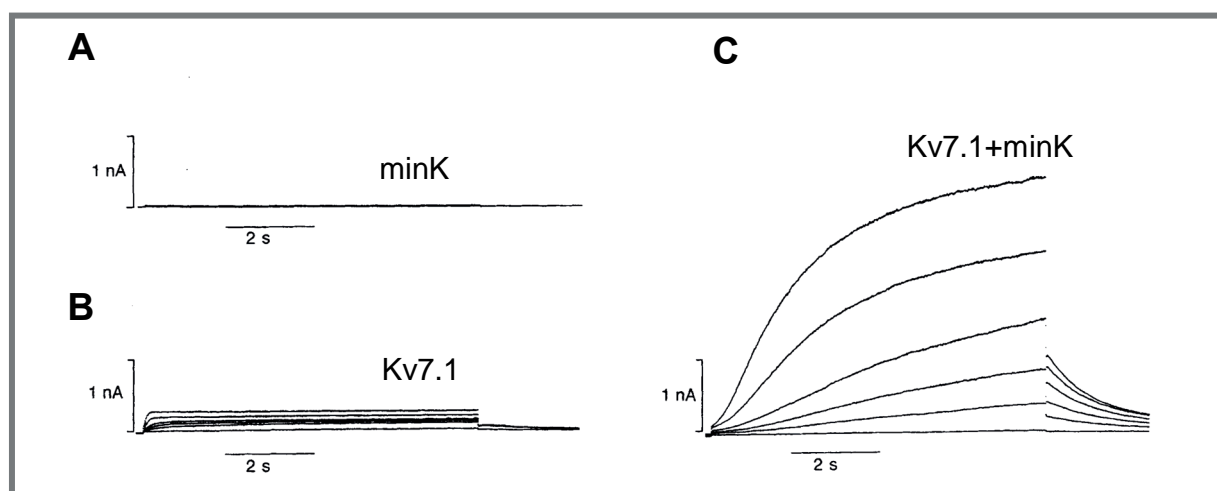
El componente lento de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004). La importancia de la  $I_{Ks}$  en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTLC, SQTLC, FA).

##### *IV.a. Características de la $I_{Ks}$*

La  $I_{Ks}$  se activa a potenciales más positivos de -30 mV, alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la  $I_{Ks}$  es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable (unas 10 veces mayor que el de la  $I_{Kr}$ ) sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente prolongadas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de desactivación es también muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La  $I_{Ks}$  es la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la  $I_{Ks}$  tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan



en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).



**Figura 21. Características de la  $I_{Ks}$ .** (A y B) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B). (C) Corriente registrada en nuestro laboratorio con ambas subunidades a la vez. [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b (A y B)]

#### *V.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$*

La subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensambla con la subunidad auxiliar minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con las de la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). La expresión en sistemas heterólogos de la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 genera una corriente ( $I_{Kv7.1}$ ) que se activa rápidamente y se inactiva lentamente (Figura 21B) y cuyas características son claramente diferentes a las de la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Lee y cols., 1997). Por otro lado, la expresión de minK por sí sola no forma ningún canal funcional (Figura 21A). Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades produce un incremento de la corriente generada, un retraso de la activación del canal y la desaparición de la inactivación, de manera que se obtiene una corriente con características muy similares a las de la  $I_{Ks}$  nativa (Figura 21C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Actualmente se acepta que la  $I_{Ks}$  se genera a través de canales formados por 4 subunidades  $\alpha$  Kv7.1 ensambladas con, al menos, 2 subunidades auxiliares minK (Chen y cols., 2003a) a través de un dominio en la región C-terminal de Kv7.1 (Schmitt y cols., 2000).

Hasta el momento se han identificado en el corazón 6 isoformas diferentes de Kv7.1 debidas a modificaciones postranscripcionales, siendo las isoformas 1 y 2 las de mayor

expresión en el miocardio (Lee y cols., 1997; Pereon y cols., 2000). Además, se ha descrito que la subunidad Kv7.1 puede asociarse *in vitro* con los otros 4 miembros de la familia de proteínas codificadas por los genes KCNE (MiRP1 a MiRP4) (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

#### *IV.c. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv7.1 y minK*

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK se han relacionado con la aparición de SQTl, Síndrome de Jarvel Langer Nielsen (SJLN), SQTC y FA familiar.

Los SQTl asociados a la  $I_{Ks}$  se deben a mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK (SQTl1 y SQTl5, respectivamente) y se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales resultantes (Chouabe y cols., 1997; Schulze-Bahr y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003). De todas ellas, las mutaciones en la subunidad Kv7.1 son responsables de alrededor del 50% de los casos de SQTl (Roberts, 2006). Además, se ha descrito una mutación en el gen que codifica la proteína yotiao (proteína de anclaje para la PKA, AKAP, *A-Kinase Anchoring Protein*) que también cursa con prolongación del intervalo QT (SQTl11) (Chen y cols., 2007). La regulación  $\beta$ -adrenérgica de la  $I_{Ks}$  requiere el ensablaje de la proteína yotiao con la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (Marx y cols., 2002).

Existen además otras mutaciones en los genes KCNQ1 y KCNE1 relacionadas con la aparición del SJLN (síndrome de Jervell y Lange-Nielsen), variante autosómica recesiva del SQTl, que se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales que se forman (Chouabe y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

Por otra parte, se ha descrito una mutación en la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (Val307Leu) que produce una ganancia de función del canal y que está relacionada con la aparición de SQTC (SQTC2) (Bellocq y cols., 2004) y mutaciones en Kv7.1 (Chen y cols., 2003b) y minK (Yang y cols., 2004) que se caracterizan también por producir una ganancia de función de los canales que generan y que se han asociado con la aparición de FA familiar.

## 2.3.2. Canales 4TM/2P

Los canales 4TM/2P (también llamados  $K_{2P}$ ) se ensamblan como dímeros y generan corrientes “de fondo” (*background*) en una gran variedad de tejidos, aunque en el tejido cardíaco sus niveles de expresión son muy bajos o incluso nulos (Lesage y Lazdunski, 2000).

Desde que se clonó el primer canal de esta familia, el canal TASK-1 (Lesage y cols., 1996), se han clonado un gran número de estos canales que se clasifican en diferentes familias basándose en sus características farmacológicas y funcionales (Lesage y Lazdunski, 2000). A nivel cardíaco se han identificado 5 familias:

Familia	Canal	Gen	Cromosoma	Localización
TWIK	$K_{2P1.1}$ (TWIK-1)	KCNK1	1q42	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas
	$K_{2P6.1}$ (TWIK-2)	KCNK6	19q11	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas, leucocitos
	$K_{2P7.1}$ (TWIK-3)	KCNK7	11q12	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, placenta, páncreas
	$K_{2P8.1}$ (TWIK-4)	KCNK8	11q12	
TREK/ TRAAK	$K_{2P2.1}$ (TREK-1)	KCNK2	1q41	SNC, corazón, placenta, pulmón, riñón
	$K_{2P10.1}$ (TREK-2)	KCNK10	14q32	SNC, páncreas, bazo, testículos
	$K_{2P4.1}$ (TRAAK)	KCNK4	11q12	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos, retina
TASK	$K_{2P3.1}$ (TASK-1)	KCNK3	2p24	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, testículos, bazo, retina, intestino, piel, útero
	$K_{2P5.1}$ (TASK-2)	KCNK5	6p21.1	SNC, ME, corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, útero
	$K_{2P9.1}$ (TASK-3)	KCNK9	8q24.3	SNC, corazón, hígado, pulmón, placenta, páncreas, testículos, leucocitos
	$K_{2P14.1}$ (TASK-4)	KCNK14		
	$K_{2P15.1}$ (TASK-5/KT3.3)	KCNK15	20q12	SNC, ME, placenta, testículos, páncreas
TALK	$K_{2P16.1}$ (TALK-1)	KCNK16	6p21	Páncreas
	$K_{2P17.1}$ (TALK-2)	KCNK17	6p21	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, páncreas, testículos, ovario, leucocitos
THIK	$K_{2P13.1}$ (THIK-1)	KCNK13	14q32	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos
	$K_{2P12.1}$ (THIK-2)	KCNK12	2p21	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos

**Tabla 12. Familias de canales de  $K^+$  4TM/2P.** ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Los canales TWIK (*Tandem of P domains in Weak Inward rectifier  $K^+$  channels*), que presentan una pequeña rectificación interna.

- Los canales TREK/TRAAK (*TWIK-RElated K<sup>+</sup> channels* y *TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K<sup>+</sup> channels*), que son activados por ácidos grasos poliinsaturados y por la distensión de la membrana (*stretch*).
- Los canales TASK (*TWIK-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channels*), que son sensibles a la acidosis.
- Los canales TALK (*TWIK-related ALkalosis-activated K<sup>+</sup> channels*), que son sensibles a la alcalosis.
- Los canales THIK (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channels*), que son inhibidos por halotano.

Posteriormente, se adoptó una nueva nomenclatura para nombrar estos canales (K<sub>2P</sub>x.y) y los genes que los codifican (KCNK1 a KCNK17) (Tabla 12). Los canales K<sub>2P</sub> poseen una región central muy conservada (segmentos TM1 a TM4) y una gran diversidad en los extremos C- y N-terminales intracelulares (Figura 11B). En estos canales se conserva la secuencia G(Y/F)G en el primer poro, aunque en el segundo poro es reemplazada por la secuencia G(F/L)G. El hecho de que los canales K<sub>2P</sub> estén abiertos de forma casi continua sugiere su posible implicación en la regulación del  $E_m$  y de la excitabilidad celular (Lesage y Lazdunski, 2000; Patel y Honoré, 2001; O'Connell y cols., 2002).

### 3. CANALES 2TM/1P

Los canales 2TM/1P, también denominados canales de K<sup>+</sup> rectificadores internos (Kir), desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda a los S5 y S6 de los canales Kv. Sin embargo, los canales Kir carecen de una estructura semejante al aparato sensor de voltaje de los canales Kv (S1 a S4), lo que concuerda con los estudios electrofisiológicos que demuestran que la conductancia de los canales Kir depende de la diferencia entre el  $E_m$  y el  $E_K$ , y no sólo del  $E_m$ .

#### 3.1. Una familia de canales de K<sup>+</sup> con rectificación interna

Hace 60 años se describió por primera vez el fenómeno de la rectificación interna. En 1949, Bernard Katz (Katz, 1949) describió en el músculo esquelético una nueva corriente de

$K^+$  cuya amplitud, al contrario de lo descrito hasta entonces, aumentaba a potenciales más negativos del  $E_K$  y disminuía con potenciales despolarizantes. En los años siguientes, se demostró la presencia de corrientes rectificadoras internas similares en el músculo cardíaco de diferentes especies (Weidmann, 1955; Hutter y Noble, 1960; Rougier y cols., 1968; Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970) y se describieron las principales características de esta rectificación interna. Pero no fue hasta los años 90, con el auge de las técnicas de biología molecular, cuando se consiguieron clonar los primeros canales que generaban este tipo de corrientes (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b) y describir los mecanismos moleculares de la rectificación interna (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995). Posteriormente, los estudios genéticos y el uso de modelos animales han permitido la identificación y caracterización de mutaciones de estos canales que son responsables de alteraciones que afectan la excitabilidad cardíaca.

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kir1 (ROMK)</b>		Kir1.1-1.3	KCNJ1	17q25	Riñón, corazón, páncreas
<b>Kir2 (IRK)</b>	$I_{K1}$	Kir2.1	KCNJ2	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
	$I_{K1}$	Kir2.2	KCNJ12	17p11.1	Corazón
	$I_{K1}$	Kir2.3	KCNJ4	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	KCNJ14	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
<b>Kir3 (GIRK)</b>	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	KCNJ3	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	KCNJ6	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	KCNJ9	1q21-23	SNC
	$I_{K,ACh}$	Kir3.4	KCNJ5	11q24	Corazón, páncreas
<b>Kir4 (BIR10)</b>		Kir4.1	KCNJ10	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
<b>Kir5</b>		Kir5.1	KCNJ16	17q23.1-24.2	SNC, SNP
<b>Kir6</b>	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Heterogénea
	$I_{K,ATP}$	Kir6.2	KCNJ11	11p15.1	Heterogénea
<b>Kir7</b>		Kir7.1	KCNJ13	2q37	SNC, riñón, tiroides

**Tabla 13. Familias de canales de  $K^+$  2TM/1P en mamíferos.** ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

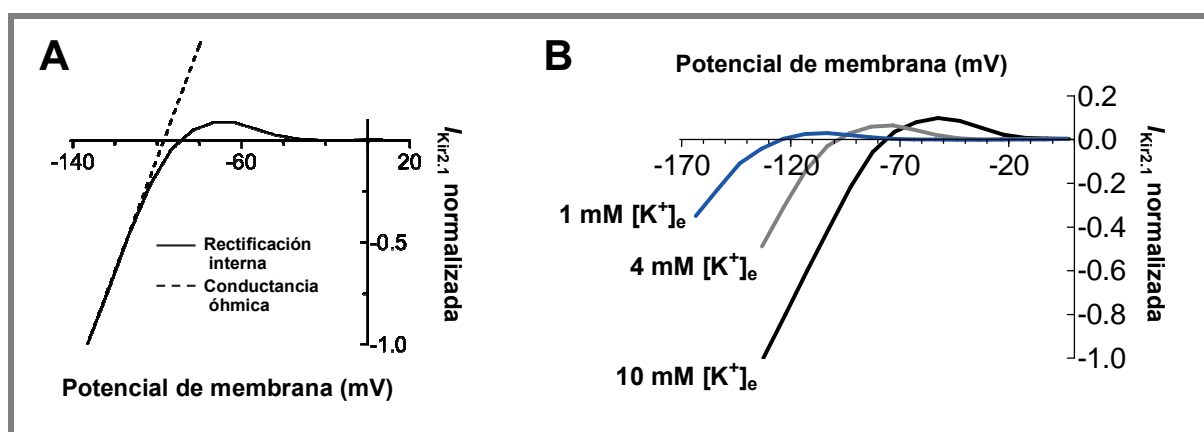
Tras el clonaje de los primeros canales Kir (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b), se han identificado muchas más proteínas pertenecientes a esta familia de canales. Además, se ha unificado la nomenclatura de los genes que codifican las proteínas que forman los canales Kir, que han sido nombrados como KCNJ. Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (Tabla 13), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología

estructural de entre un 30 y un 40%, mientras que dentro de cada subfamilia el grado de homología llega a alcanzar el 60%.

Los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7).

### 3.2. La rectificación interna en los canales Kir

Los canales rectificadores internos representan una gran familia de canales de  $K^+$  en la que sus miembros comparten bastantes semejanzas estructurales. Sin embargo, aunque todos los canales Kir presentan una relación I-V con rectificación interna, existen grandes diferencias en su grado de rectificación, su regulación y su distribución (Tabla 13). Las subfamilias Kir2 y Kir3 son las que presentan corrientes con una rectificación interna más marcada (los canales que se han denominado como “muy rectificadores”) (Figura 22), similar a la originalmente descrita por Katz en músculo esquelético (Katz, 1949). En el corazón, sólo hay dos corrientes con estas características: la  $I_{K1}$ , una corriente constitutivamente activa que presenta mayor densidad en el ventrículo que en la aurícula, y la  $I_{K,ACH}$ , una corriente activada por la estimulación del receptor muscarínico  $M_2$  y que presenta mayor densidad en el tejido auricular, en el nodo AV y en el nodo SA, donde juega un papel muy importante en la regulación vagal de la frecuencia cardíaca.



**Figura 22. Características de la rectificación interna en la  $I_{K1}$ .** (A) Relación I-V de la corriente  $I_{Kir2.1}$ . Se muestra la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). (B) Efectos de la  $[K^+]_e$  sobre la  $I_{Kir2.1}$ . [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005 (A) y Gómez y cols., 2009 (B)]

Existe una tercera corriente cardíaca con rectificación interna, la  $I_{K,ATP}$ , cuya actividad está regulada por las concentraciones intracelulares de ATP y ADP, aunque es una corriente que presenta una rectificación mucho más débil (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

### 3.2.1. Propiedades de la rectificación interna “clásica”

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra- y extracelular). Las resistencias que son independientes del tiempo y del voltaje tienen una relación I-V lineal que se describe mediante la ley de Ohm:

$$(7) \quad \text{Voltaje} = \text{Intensidad} \cdot \text{Resistencia}$$

La rectificación interna se puede describir como una relación I-V no lineal donde aparece una reducción muy marcada y dependiente de voltaje de la amplitud de la corriente conforme se produce la despolarización de la membrana. Esta reducción, que tiene lugar aproximadamente en el rango de potenciales entre -60 y -20 mV, presenta lo que se denomina como “pendiente negativa” (Figura 22A), que es característica de este tipo de canales. Como resultado de esta relación I-V no lineal, se obtiene una corriente mayor en un sentido que en otro: los canales de  $K^+$  que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del  $E_K$ , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de mucha menor amplitud (Figura 22).

Otra propiedad exclusiva de estas corrientes es que la rectificación presenta dependencia de la  $[K^+]_e$ . Concretamente, un aumento de la  $[K^+]_e$  produce una despolarización del  $E_K$ , un aumento de la probabilidad de apertura y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del  $E_K$ ), dando lugar a un fenómeno de “sobrecruzamiento” (o *crossover*) entre las relaciones I-V obtenidas para cada una de las diferentes  $[K^+]_e$  (Figura 22B). Una importante consecuencia de este fenómeno es que la amplitud de la corriente aumenta a potenciales más positivos del punto de “sobrecruzamiento” en lugar de disminuir, como sería de esperar debido a la reducción de la fuerza electromotriz que se produce al aumentar la  $[K^+]_e$  (Figura 22B).

### 3.2.2. Mecanismos moleculares de la rectificación interna

Hace 40 años, Clay Armstrong sugirió que la rectificación interna de estos canales podría deberse al bloqueo dependiente de voltaje del poro iónico por una molécula cargada positivamente, y que la disociación de este bloqueante de su sitio de unión al canal por el  $K^+$  extracelular explicaría la anómala dependencia de la  $[K^+]_e$  que presenta la corriente de salida (Armstrong, 1969). A finales de los años 80, se demostró que el  $Mg^{2+}$  intracelular puede

ocasionar la rectificación interna de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares a través del bloqueo del poro del canal (Matsuda y cols., 1987; Vandenberg, 1987). Sin embargo, las propiedades de la rectificación ocasionada por el  $Mg^{2+}$  no son suficientes para describir cuantitativamente la fuerte rectificación que exhibe esta corriente, ya que la dependencia de voltaje del bloqueo producido por el  $Mg^{2+}$  es débil, y en muchas células la rectificación persiste aún cuando se elimina el  $Mg^{2+}$  (Oliva y cols., 1990; Martin y cols., 1995). El modelo de rectificación interna basado en una partícula inactivante volvió a ser tenido en consideración poco tiempo después gracias al clonaje de los primeros canales Kir a principios de los 90 (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b), que facilitó el estudio de los procesos de rectificación. A partir de entonces, diversos trabajos demostraron que las propiedades básicas de la rectificación interna se podían explicar por el potente bloqueo dependiente de voltaje producido por una familia de cationes orgánicos intracelulares denominados poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Las poliaminas están presentes en todos los tipos celulares y sus concentraciones intracelulares alcanzan el rango milimolar bajo (Cohen, 1998). Sin embargo, sólo las poliaminas libres originan la rectificación de los canales Kir (Yan y cols., 2005) y la mayoría de las poliaminas se encuentran unidas a diferentes moléculas intracelulares como el ADN, el ARN o el ATP (Watanabe y cols., 1991). Entre las poliaminas, la espermina (tetraivalente) es la más potente a la hora de ocasionar rectificación interna, seguida de la espermidina (trivalente), la putrescina (divalente) y los iones  $Mg^{2+}$  (Lopatin y cols., 1994). De acuerdo con el mecanismo de la rectificación interna que se ha descrito, la “activación” de los rectificadores internos con la hiperpolarización de la membrana se debe a la disociación de las poliaminas y el  $Mg^{2+}$  de sus sitios de unión en el poro. La espermina es la que presenta una cinética de disociación más lenta, mientras que la disociación tanto de putrescina como de  $Mg^{2+}$  es prácticamente instantánea (Lopatin y cols., 1995; Ishihara, 1997).

### 3.2.3. Determinantes moleculares de la rectificación interna

Se han identificado varios aminoácidos que resultan críticos en la rectificación de los canales Kir. Entre ellos destacan un ácido aspártico localizado en el M2 a la altura de la cavidad hidrófila (correspondiente al D172 en la subunidad Kir2.1) (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a) y dos ácidos glutámicos localizados en la porción citoplásmica (correspondientes a los residuos E224 y E299 en la subunidad Kir2.1) (Yang y cols., 1995a; Kubo y Murata, 2001; John y cols., 2004).



Se ha demostrado que las poliaminas se unen con gran afinidad a un sitio próximo tanto al D172 como al filtro de selectividad, mientras que el anillo acídico formado por el E224 y el E299 constituye un sitio de unión de baja afinidad (Figura 23) (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004). Ambos sitios parecen actuar de forma coordinada, sirviendo el anillo formado por los 8 ácidos glutámicos (2 por cada subunidad) como un primer sitio de unión que no ocluye el poro totalmente, pero que favorece la posterior unión al residuo D172, lo que produce entonces el bloqueo completo del poro y el cese del paso de iones  $K^+$  a su través (Figura 23C) (Xie y cols., 2003). Además, la gran longitud del poro permite la unión de dos o más moléculas de espermina (la poliamina de mayor longitud con  $\approx 16-18 \text{ \AA}$ ) a un mismo tiempo. Sin embargo, estos residuos no son los únicos responsables de la rectificación y, de hecho, se ha demostrado la implicación de otros residuos cargados (los ácidos aspárticos en las posiciones 255 y 259, principalmente) (Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007).

Se ha relacionado la cantidad de cargas negativas presentes en la cavidad hidrófila del poro con el grado de rectificación que presenta el canal (Pegan y cols., 2005). Así, los canales que presentan mayor rectificación (Kir2) presentan 5 cargas negativas (los residuos D172, E224, D255, D259 y E299 en Kir2.1) mientras que un canal poco rectificador como es el Kir6.2 sólo presenta 1 de estas cargas. En este sentido, la introducción de un residuo cargado negativamente adicional orientado hacia la cavidad hidrófila del poro en este canal le confiere características de canal muy rectificador (Kurata y cols., 2004).

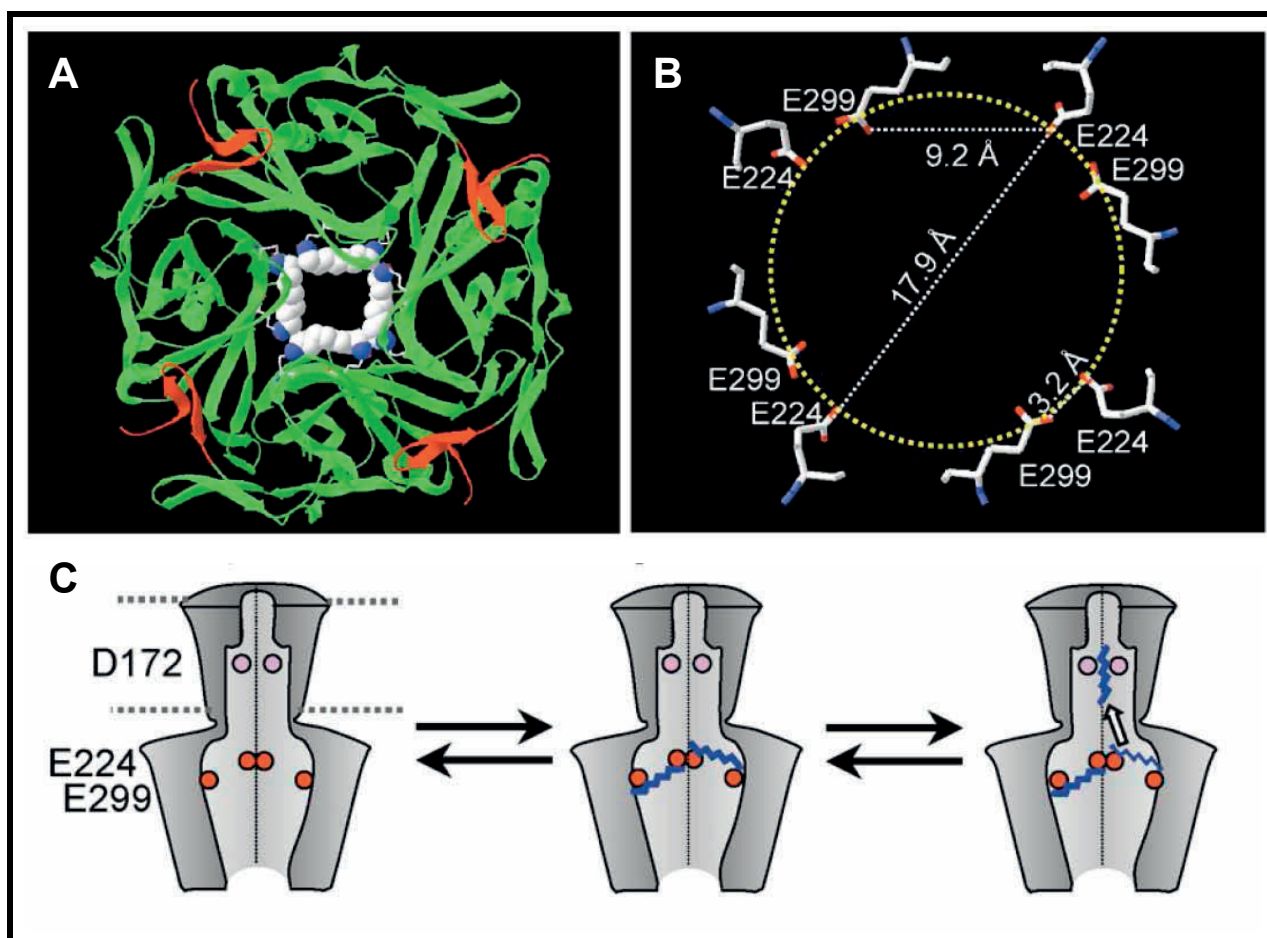
Sin embargo, la cantidad de cargas negativas no es capaz de explicar por sí sola el fenómeno de la rectificación ya que existen excepciones, como el canal Kir4.1 (muy rectificador, aunque presenta “sólo” 3 cargas) (Fakler y cols., 1996a) o el canal Kir7.1 (poco rectificador, aunque también presenta 3 cargas) (Döring y cols., 1998).

A pesar de todos los estudios existentes sobre el fenómeno de la rectificación inducido por poliaminas, existen ciertos detalles del mecanismo de bloqueo, como el origen de la dependencia de voltaje de la rectificación (Shin y Lu, 2005) o la identificación de los sitios de unión de las poliaminas (Kurata y cols., 2006 y 2007), que siguen sin estar plenamente resueltos. Por ello, diversos autores han propuesto mecanismos diferentes para explicar la rectificación (Aleksandrov y cols., 1996; Lee y cols., 1999).

### **3.3. Estructura de los canales 2TM/1P**

La arquitectura general de los canales Kir y los principales determinantes moleculares de su permeabilidad al  $K^+$  y la rectificación han sido ampliamente descritos. A partir de las

estructuras cristalizadas de diferentes canales bacterianos homólogos primero (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a; Jiang y cols., 2002b; Kuo y cols., 2003), de la cristalización de la estructura del dominio citoplásmico de varios canales Kir de mamíferos después (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005) y del canal Kir2.2 completo (Tao y cols., 2009) se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de este tipo de canales de  $K^+$  (Figura 25 y Tabla 14).



**Figura 23. Determinantes moleculares de la rectificación interna inducida por poliaminas.** (A) Vista superior de la región del poro citoplásmico de Kir2.1, con los residuos E224 y E299 orientados hacia el poro y 4 moléculas de diamina (DA8) unidas a ellos. (B) Representación esquemática de la geometría de la región del poro citoplásmico en la que se muestran las distancias intra e intermoleculares entre los residuos E224 y E299. (C) Modelo de coordinación entre el sitio de unión de las poliaminas en el poro transmembrana (D172) y los sitios de unión en el poro citoplásmico (E224 y E299). [Adaptadas de Xie y cols., 2003]

Atendiendo a su secuencia, los canales Kir presentan una homología mayor que la de otros canales de  $K^+$ . Esta homología no se reduce sólo a los segmentos TM (como ocurre en los canales Kv, por ejemplo), sino que se extiende desde aproximadamente 40 aminoácidos antes del primer segmento TM (denominado M1) hasta alrededor de 200 aminoácidos más allá del segundo segmento TM (denominado M2), lo que significa casi los dos tercios de la proteína y

sugiere que estas regiones se encuentran formando una estructura organizada, posiblemente con una función común para todos los canales Kir.

Canal	Característica	Resolución	PDB id	Especie	Referencias
<i>KcsA</i>	Activado por pH	2.0 Å	1BL8	<i>Streptomyces lividans</i>	Doyle y cols., 1998
<i>KcsA</i>	Activado por pH	-	1F6G	<i>Streptomyces lividans</i>	Cortés y cols., 2001
<i>MthK</i>	Activado por Ca <sup>2+</sup>	3.30 Å	1LNQ	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Jiang y cols., 2002b
Kir3.1	Domino intracelular	1.80 Å	1N9P	<i>Ratus norvegicus</i>	Nishida y MacKinnon, 2002
<i>KirBac1.1</i>	Rectificador interno	3.65 Å	1P7B	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Kuo y cols., 2003
Kir2.1	Dominio intracelular	2.40 Å	1U4F	<i>Mus musculus</i>	Pegan y cols., 2005
Kir3.1	Dominio intracelular	2.10 Å	1U4E	<i>Ratus norvegicus</i>	Pegan y cols., 2005
<i>KirBac3.1</i>	Rectificador interno	9.0 Å	1XL4	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	Kuo y cols., 2005
<i>KirBac1.3</i> + <i>Kir3.1</i>	Quimera	2.20 Å	2QKS	<i>Burkholderia xenovorans</i> + <i>Mus musculus</i>	Nishida y cols., 2007
<i>Kir2.2</i>	Canal completo	3.10 Å	3JYC	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Tao y cols., 2009

**Tabla 14. Canales 2TM/IP cuya estructura cristalográfica ha sido resuelta.** PDB id: Número de acceso a la estructura cristalizada y depositada en el *Protein Data Bank*.

#### • Dominio transmembrana

Los primeros canales 2TM/IP cristalizados fueron los canales bacterianos *KcsA* (Figura 25A) (Doyle y cols., 1998) y *MthK* (Figura 25B) (Jiang y cols., 2002a). La estructura resuelta para ambos canales demuestra que están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  dispuestas simétricamente alrededor de un poro central. Cada subunidad consta de dos segmentos TM (M1 y M2) con una estructura de hélice  $\alpha$  y los segmentos N- y C-terminales, que son intracelulares. El M1 y el M2 están conectados por una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos (denominada “lazo P”) en la que se encuentra una porción con estructura en hélice  $\alpha$  (denominada H5) y el filtro de selectividad del canal (la secuencia T-X-G-Y(F)-G) (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a). El segmento M2 tapiza la luz del poro, mientras que el segmento M1 se encuentra orientado hacia el exterior del poro, embebido en la membrana lipídica.

Mientras que el canal *KcsA* fue cristalizado en una configuración cerrada, el canal *MthK* fue cristalizado en una configuración abierta, por lo que la resolución de ambas estructuras

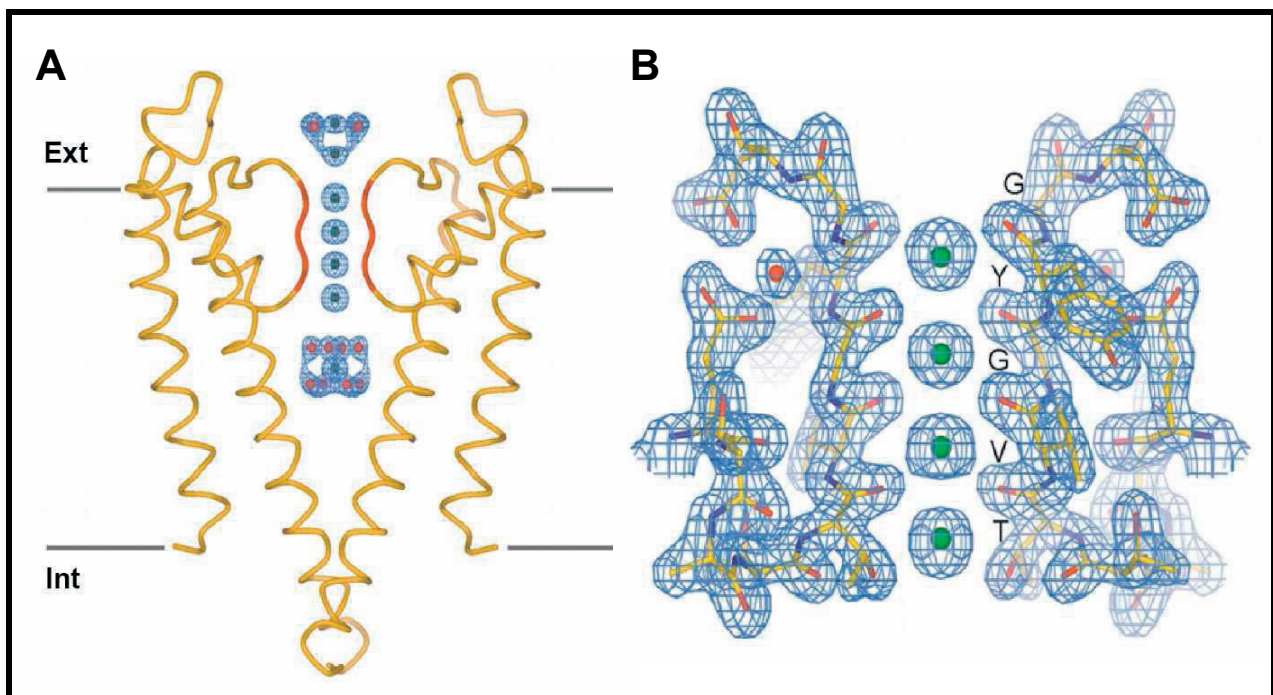
permitió una primera descripción de los cambios que se producen en el canal en las transiciones entre ambos estados (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a). En el estado abierto, las hélices de los segmentos M2 se desplazan hacia el exterior, de manera que la boca intracelular del poro se ensancha y permite el flujo de iones desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad (Jiang y cols., 2002a). Este ensanchamiento en la boca citoplásmica del canal es posible gracias a la presencia de un residuo glicina (en la posición 99 en el *KcsA* y en la 83 en el *MthK*) que le confiere flexibilidad y funciona a modo de bisagra (Perozo, 2002).

Posteriormente, se resolvió la estructura de los canales bacterianos KirBac1.1 (Kuo y cols., 2003) y KirBac3.1 (Kuo y cols., 2005), muy similares a los canales anteriormente descritos salvo por el hecho de que presentan una pequeña hélice adicional (formada por 11 residuos y denominada “*slide helix*”) situada en el extremo N-terminal del M1 y que se dispone paralela a la membrana plasmática (Figura 25D). El canal KirBac1.1 presenta además una fenilalanina en la posición 146 (en la región inferior del M2), similar a la que presenta el canal *KcsA* en la misma región, que se ha propuesto que interviene en el control de la apertura del poro (Kuo y cols., 2003). Comparado con el otro canal cristalizado en estado cerrado (*KcsA*), el canal KirBac1.1 presenta una cavidad central hidrófila más pequeña ( $\approx 10$  Å de diámetro) y una diferente disposición de los aminoácidos del filtro de selectividad (Kuo y cols., 2003).

Pese a la pequeña diferencia entre los radios atómicos del  $K^+$  (1.33 Å) y del  $Na^+$  (0.95 Å), los canales de  $K^+$  son capaces de discriminar entre ambos con una selectividad superior a 1000 veces y conseguir una velocidad de conducción de  $\approx 10^8$  iones/s. El filtro de selectividad se encuentra en una región del lazo P formada por una secuencia de aminoácidos altamente conservada en todos los canales de  $K^+$  denominada “secuencia de selectividad al  $K^+$ ” y que se caracteriza por presentar la secuencia T-X-G-Y(F)-G (Figura 24) (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994).

Una vez en la cavidad central, el ion  $K^+$  pierde su capa de solvatación para acceder al filtro de selectividad. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno de los radicales carbonilos de los residuos T-X-G-Y(F)-G hacen las veces de moléculas de agua, de manera que, durante su paso a través del filtro de selectividad, los iones  $K^+$  se encuentran rodeados de ocho átomos de oxígeno en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones  $K^+$  en el medio acuoso (Figura 24B) (Roux y MacKinnon, 1999; Zhou y MacKinnon, 2003). El menor radio atómico del  $Na^+$  hace que la distancia hasta los átomos de oxígeno que lo rodean al

atravesar el filtro de selectividad sea mayor y, por tanto, su deshidratación no sea energéticamente tan favorable como la de los iones  $K^+$ .



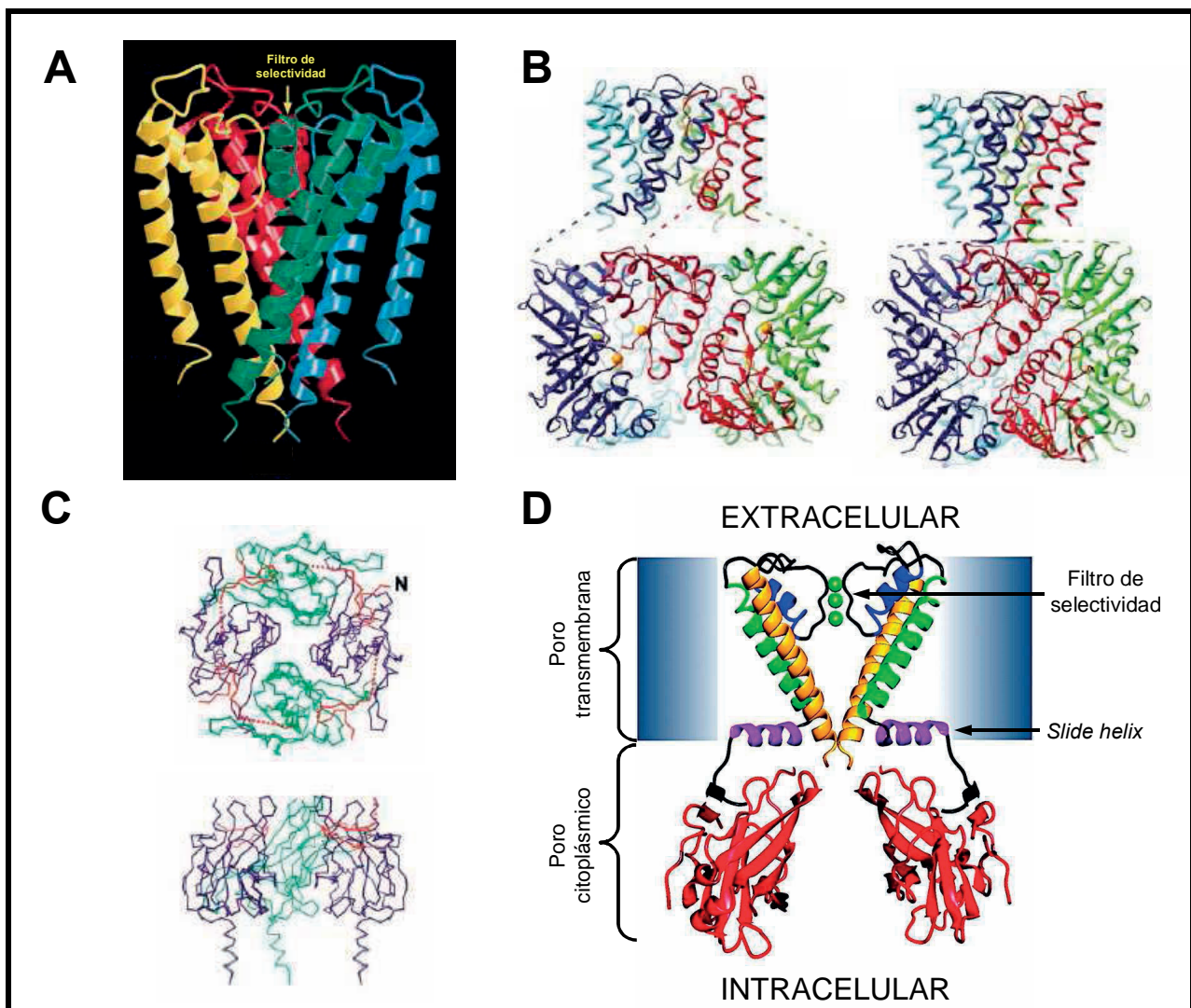
**Figura 24 Representación esquemática del filtro de selectividad de los canales de  $K^+$ .** (A) Representación esquemática de dos de las subunidades que forman el canal *KcsA* en una vista lateral, con la región que forma el filtro de selectividad señalada en rojo. Los sitios de unión de los iones  $K^+$  se representan como esferas verdes y las moléculas de agua como esferas rojas. (B) Detalle de la secuencia del filtro de selectividad del canal *KcsA*, donde se representan como esferas verdes los cuatro posibles ocupados por los iones  $K^+$ . [Adaptadas de Zhou y MacKinnon, 2003]

Además, el filtro de selectividad presenta una longitud de  $\approx 12 \text{ \AA}$ , por lo que se ha postulado que a lo largo del filtro pueden llegar a encontrarse 2 iones  $K^+$  ( $\approx 2.7 \text{ \AA}$ ) separados por una molécula de agua (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003), de manera que la entrada del segundo ion produciría una repulsión electrostática mutua que compensaría la atracción del filtro de selectividad por el primer ion  $K^+$  y produciría su salida hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

- Dominio citoplásmico

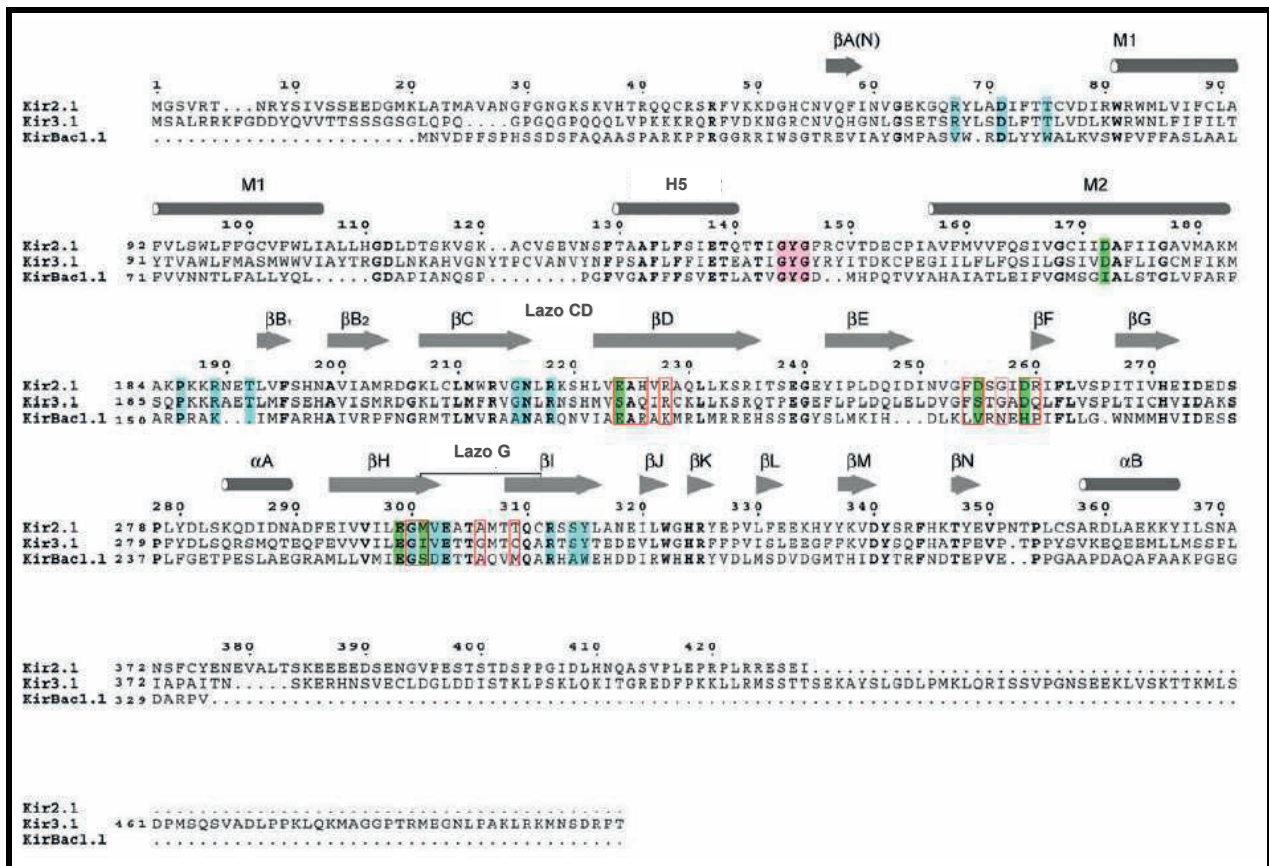
Hasta la fecha se ha obtenido la estructura cristalizada del dominio intracelular del canal KirBac1 (Kuo y cols., 2003) y de los canales de mamífero Kir3.1 (Figura 25C) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), Kir3.2 (Inanobe y Kurachi, 2011), Kir2.1 (Pegan y cols., 2005) y Kir2.2 (Tao y cols., 2009; Hansen y cols., 2011). Todas estas estructuras cristalizadas comprenden una pequeña porción del extremo N-terminal (aminoácidos del 41 al

64 del Kir2.1, del 40 al 63 del Kir2.2 y del 41 al 63 del Kir3.1) y el extremo C-terminal casi completo (aminoácidos del 189 al 428 del Kir2.1, del 188 al 427 del Kir2.2 y del 189 al 371



**Figura 25. Canales 2TM/1P.** (A) Estructura del canal *KcsA* en una visión lateral del tetrámero. (B) Estructura cristalizada del canal *MthK* en el estado abierto (a la izquierda) y modelo hipotético de su configuración cerrada (a la derecha). (C) Estructura del dominio intracelular del canal Kir3.1 en una visión superior (desde la membrana hacia el citoplasma) (panel superior) y en una visión lateral (panel inferior). (D) Modelo de la estructura de dos de las subunidades que forman los canales Kir2 basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1. Se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 y M2 (en verde y amarillo, respectivamente), el lazo P (en azul) y el dominio citoplásmico (en rojo). [Adaptadas de Doyle y cols., 1998 (A), Jiang y cols., 2002b (B), Nishida y MacKinnon, 2002 (C) y Kuo y cols., 2003 (D)]

del Kir3.1). Las estructuras de los canales Kir3.1 y Kir2.1 fueron resueltas en ausencia de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), por lo que se ha propuesto que representan el estado cerrado del canal (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Recientemente se han podido cristalizar las estructuras de Kir2.2 y Kir3.2 en presencia de PIP<sub>2</sub> (Hansen y cols., 2011; Whornton y MacKinnon, 2011) ofreciendo una visión más amplia del estado abierto del canal.



**Figura 26. Alineamiento de las secuencias de los canales Kir2.1, Kir3.1 y KirBac1.1.** En gris, los diferentes elementos de la estructura secundaria del dominio transmembrana (M1, H5 y M2) y del dominio citoplásmico: 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A y  $\alpha$ B) y 14 segmentos  $\beta$  ( $\beta$ A a  $\beta$ N) y en recuadros rojos, los residuos que miran al poro citoplásmico. Además, aparecen señalados los residuos GYG del filtro de selectividad (en rosa) y algunos residuos relacionados con el síndrome de Andersen (en azul) o implicados en la rectificación (en verde). [Adaptada de Pegan y cols., 2005]

El dominio citoplásmico de los canales Kir está formado por aminoácidos de las cuatro subunidades del tetrámero y presenta importantes diferencias respecto a las estructuras tetraméricas de los dominios T1 (Kreusch y cols., 1998) y de las subunidades  $\beta$  (Gulbis y cols., 1999 y 2000) de los canales Kv ya que éstos no forman un poro central que permita el paso de los iones  $K^+$ , sino que su papel parece limitarse a mediar las interacciones entre las subunidades del canal y de los canales con otras proteínas y ligandos intracelulares. La longitud del dominio citoplásmico de los canales Kir es, al menos, la misma que la de la porción transmembrana (Figura 25D), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total que es aproximadamente el doble de la de otros canales de  $K^+$  ( $\approx 60$  Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, diferentes estudios han permitido determinar que el diámetro del poro citoplásmico es de alrededor de 20 Å en estado abierto (Lu y cols., 1999) y de entre 7 y 15 Å en estado cerrado (Nishida y MacKinnon, 2002), es decir, lo suficientemente amplio como para permitir la presencia de los iones hidratados en su interior en ambos casos.

Las estructuras resueltas muestran una elevada organización en los dominios citoplásmicos de los canales Kir3.1, Kir3.2, Kir2.1 y Kir2.2 (Nishida y MacKinnon, 2002; Inanobe y Kurachi, 2011, Pegan y cols., 2005, Tao y cols., 2009, Hansen y cols., 2011), habiéndose descrito la presencia de 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A y  $\alpha$ B) y 14 segmentos  $\beta$  ( $\beta$ A a  $\beta$ N) (Figura 25). Básicamente, en cada subunidad se distinguen tres elementos: dos láminas  $\beta$  (formadas por los segmentos  $\beta$ D,  $\beta$ E,  $\beta$ H y  $\beta$ I la primera y por los segmentos  $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\beta$ G y  $\beta$ J la segunda) que se encuentran en el interior de cada subunidad, y una tercera lámina  $\beta$  (formada por los segmentos  $\beta$ A,  $\beta$ L y  $\beta$ M) que se dispone en el exterior, cerca de la cara interna de la membrana (Figuras 25 y 26) (Pegan y cols., 2005). En esta tercera lámina, cada uno de los 4 segmentos  $\beta$ A, localizados en los extremos N-terminales, interacciona con el extremo C-terminal de una subunidad vecina, por lo que se ha sugerido que estos segmentos participan en el ensamblaje de los dominios citoplásmicos de las subunidades Kir.

La parte más estrecha del dominio citoplásmico (2.8-5.7 Å) la constituyen dos lazos que se encuentran mirando hacia el poro, formados por los aminoácidos que se localizan entre los segmentos  $\beta$ C y  $\beta$ D (el “lazo CD”) y entre los segmentos  $\beta$ H y  $\beta$ I (el “lazo G”) (Figura 26), y que se disponen como un anillo alrededor del eje del poro (Figuras 27A y B). Curiosamente, ambos lazos se encuentran precedidos por un residuo glicina (la Gly215 antes del lazo CD y la Gly300 antes del lazo G, según la numeración de Kir2.1), lo que sugiere que son secuencias que presentan cierta flexibilidad y movilidad. De hecho, según las estructuras cristalizadas de Kir2.1, Kir2.2, Kir3.1 y Kir3.2, los lazos G de ambos canales presentan conformaciones diferentes, lo que confirma que se trata de estructuras suficientemente flexibles como para permitir los cambios conformacionales que tienen lugar con la activación del canal (Pegan y cols., 2005). La alanina en posición 306 se encuentra en la parte superior del lazo G del canal Kir2.1 (Figura 27A) y constituye el punto de mayor estrechez del poro citoplásmico. Según las estructuras cristalizadas de los dominios intracelulares de Kir2.1 y Kir3.1, la apertura del poro iónico al nivel de esta Ala306 no es lo suficientemente amplia como para permitir el paso del ion  $K^+$ , lo que parece confirmar que ambas estructuras representan el estado cerrado del canal. Estudios de mutagénesis demuestran que la sustitución de esta alanina por cualquier otro aminoácido más voluminoso da como resultado canales no funcionales, posiblemente porque se producen cambios en la conformación del lazo G que impiden estéricamente el paso de iones  $K^+$  a través del poro (Pegan y cols., 2005). En estructuras recientes se ha observado como el  $PIP_2$  facilita el desplazamiento de el lazo G (Hansen y cols., 2011; Whornton y MacKinnon, 2011).

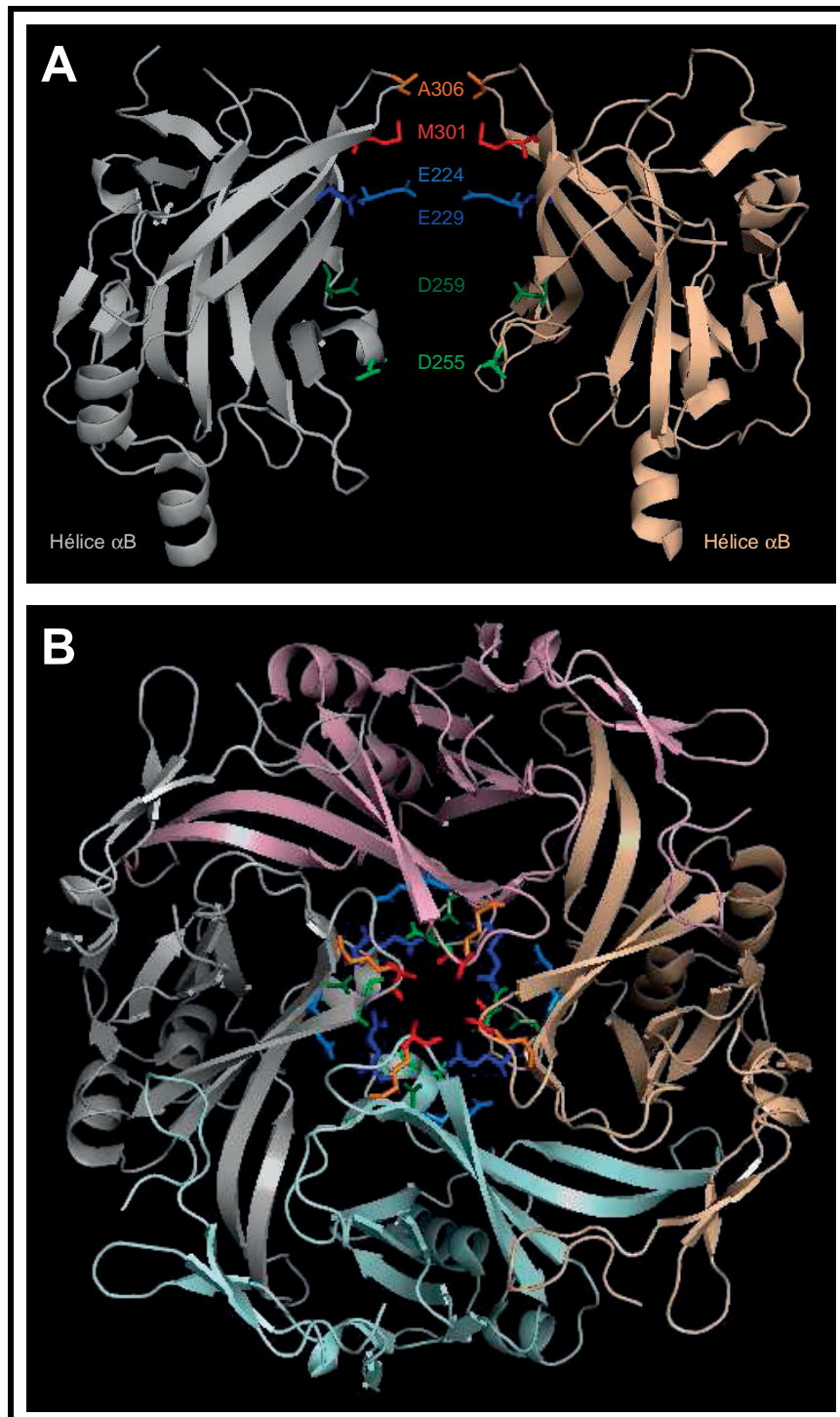


Se ha demostrado la participación de varios de los aminoácidos del lazo G en la regulación de los canales Kir: a) la sustitución de la Cys311 del canal Kir2.1 por residuos polares (serina), cargados (arginina) o alifáticos (alanina) reduce la probabilidad de apertura y modifica el *gating* del canal Kir2.1 (Garneau y cols., 2003); b) la región Glu311-Gly335 del canal Kir3.2 participa en la regulación por proteínas G de este canal (Ivanina y cols., 2004; Clancy y cols., 2005); c) el lazo G participa en la dependencia del *gating* con el pH de los canales Kir1.1 (Schulte y cols., 1998). Además, se ha propuesto que el lazo G puede participar en el *gating* de los canales Kir por promover cambios alostéricos en el filtro de selectividad o por modificar la afinidad por el PIP<sub>2</sub> (Lu y cols., 2001; Garneau y cols., 2003; Pegan y cols., 2005; Hansen y cols., 2011).

La cavidad central del poro citoplásmico presenta una alta concentración de residuos con carga negativa (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), entre los que destacan dos anillos ácidos: el primero formado por dos ácidos glutámicos (E224 y E299), y el segundo, por dos ácidos aspárticos (D255 y D259) (Figuras 25B y 28A y B).

Como se ha mencionado previamente, ambos anillos están implicados en la rectificación interna que presentan estos canales (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004; Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007). Dada la longitud del poro citoplásmico y la concentración de cargas negativas que presenta, Nishida y MacKinnon (2002) han propuesto la posibilidad de que se puedan concentrar varios iones K<sup>+</sup> en esta región del poro. Como no existen sitios específicos de interacción entre esta región del poro y dichos iones, éstos estarían localizados al azar a lo largo del poro (Nishida y MacKinnon, 2002).

Con la despolarización de la membrana, se produciría la entrada en el poro de una molécula de poliamina (cargada positivamente) desde el medio intracelular, lo que desplazaría los iones K<sup>+</sup> hacia el poro transmembrana y, de ahí, al medio extracelular. Posteriormente, la interacción de la poliamina con sus sitios de unión bloquearía el poro completamente, impidiendo el paso de más iones K<sup>+</sup> (Nishida y MacKinnon, 2002). Este mecanismo explicaría algunas de las características de la rectificación interna relacionadas con la dependencia de voltaje del bloqueo producido por poliaminas y cationes intracelulares (Lopatin y cols., 1994; Domene y cols., 2003).



**Figura 27. Estructura del dominio citoplásmico de los canales Kir. (A-B)** Estructura cristalizada del dominio citoplásmico del canal Kir2.1 (PDB: 1U4F) en vistas lateral (A) y superior (B). En diferentes colores, aparecen señalados dos de los principales residuos del lazo G (M301, en naranja, y A306, en rojo) y los residuos de los dos anillos acídicos: el anillo de ácidos glutámicos (E224 y E299, en azul claro y oscuro, respectivamente) y el anillo de ácidos aspárticos (D255 y D259, en verde claro y oscuro, respectivamente).

La hélice  $\alpha$  presente en el extremo C-terminal del dominio citoplásmico (la hélice  $\alpha$ B) protuye hacia el interior celular (Figuras 25C y 28A) (Nishida y MacKinnon, 2002). La porción del extremo C-terminal que se extiende más allá del segmento  $\beta$ N (donde se incluye esta hélice  $\alpha$ B) presenta una homología mucho menor entre los diferentes canales Kir que el

resto de la proteína, por lo que se puede descartar una función común de esta región para todos ellos. Sin embargo, si se compara la secuencia de esta hélice  $\alpha B$  de los miembros de una misma subfamilia, la homología sigue siendo muy elevada, por lo que se ha propuesto que puede estar participando en las interacciones del canal con otras proteínas o mediadores intracelulares. Esto ocurre, por ejemplo, para los 4 canales Kir regulados por proteínas G (canales Kir3.1-Kir3.4) (Yamada y cols., 1998), por lo que se ha sugerido que esta región podría participar en la regulación de los canales Kir3 por proteínas G (Albsoul-Younes y cols., 2001; Nishida y MacKinnon, 2002).

Más allá de la hélice  $\alpha B$ , la estructura del extremo C-terminal no ha podido ser cristalizada, lo que indica que esta región presenta una estructura extremadamente flexible y desordenada y/o que para formar una estructura rígida precisa de la presencia del extremo N-terminal completo (las estructuras de los dominios citoplásmicos cristalizados carecen de los 40 primeros aminoácidos de este extremo) o de otras proteínas citoplásmicas con las que interacciona (Pegan y cols., 2005). A este respecto, en esta región se ha identificado un dominio PDZ de interacción con proteínas de anclaje a la membrana (PSD-95, SAP90, PSD-93, SAP97) (Cohen y cols., 1996; Nehring y cols., 2000; Inanobe y cols., 2002; Leonoudakis y cols., 2004).

### 3.4. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales 2TM/1P

Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la  $I_{K1}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la  $I_{K,ACH}$ , responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ( $I_{K,ATP}$ ), responsable del acortamiento de la DPA que ocurre durante la isquemia (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

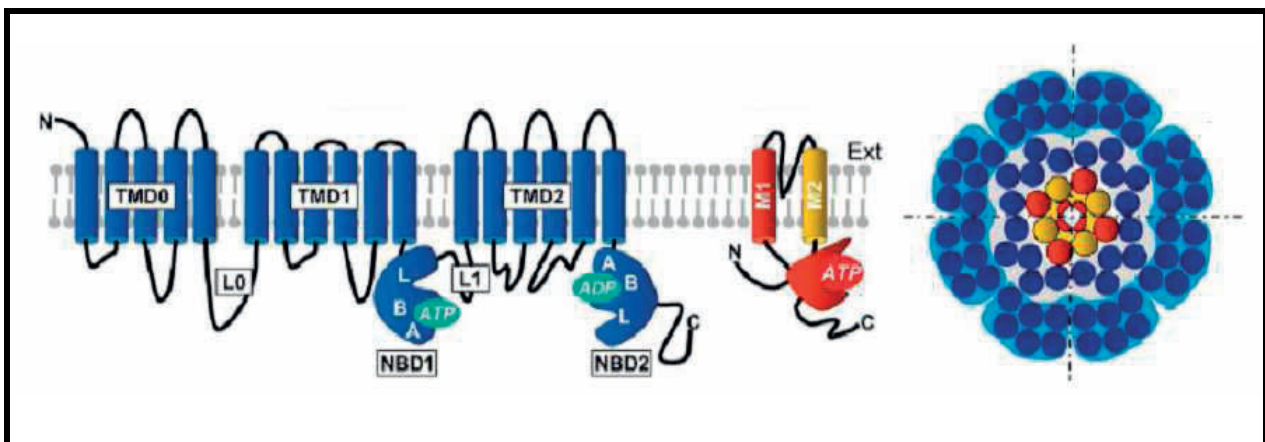
### 3.4.1. La $I_{K,ATP}$

En el corazón, la corriente rectificadora  $I_{K,ATP}$  juega un importante papel durante la isquemia miocárdica y en el preconditionamiento isquémico (Seino y Miki, 2003; Nerbonne y Kass, 2005).

#### 3.4.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$

Los canales  $K_{ATP}$  son inhibidos fisiológicamente por el ATP intracelular, lo que permite acoplar el  $E_m$  al metabolismo celular (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). En el mecanismo de rectificación intervienen los iones intracelulares  $Mg^{2+}$  y  $Na^+$ , que bloquean el canal en su estado abierto (Horie y cols., 1987).

Se ha demostrado que ratones  $Kir6.2^{-/-}$  presentan una menor tolerancia al ejercicio asociada a un aumento del volumen telesistólico residual, un inadecuado manejo del  $Ca^{2+}$ , arritmias ventriculares y muerte súbita tras la estimulación simpática, lo que sugiere que las subunidades Kir6.2 son las responsables de la adaptación al estrés (Zingman y cols., 2002).



**Figura 28. Estructura de los canales  $K_{ATP}$ .** Modelo estructural del canal  $K_{ATP}$  cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2  $\alpha$ -hélices TM y un largo dominio citoplásmico con un sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD) citoplásmicos. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

#### 3.4.1.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$

El canal  $K_{ATP}$  cardíaco es el resultado de la asociación de 4 subunidades  $\alpha$  Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Las subunidades  $\alpha$  Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades

auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2), constituidos por 5, 5 y 6 segmentos, respectivamente, y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2, *Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura 28) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Estas subunidades son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP, a las sulfonilureas y a los “activadores” del canal (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003). La hidrólisis del ATP en los sitios NBD de SUR2A permite el paso de  $K^+$  a través de la subunidad  $\alpha$  Kir6.2 (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Sin embargo, hay estudios que demuestran la existencia de canales  $K_{ATP}$  cardíacos sin la presencia de la subunidad SUR (Pu y cols., 2001), por lo que la estructura molecular exacta del canal que genera la  $I_{K,ATP}$  en el miocardio sigue siendo controvertida.

#### 3.4.1.c. Regulación de la $I_{K,ATP}$

La  $I_{K,ATP}$  se inhibe por el ATP intracelular, mientras que se activa por el adenosín difosfato (ADP), por lo que podemos decir que la actividad de los canales que la generan está regulada por el cociente ATP/ADP (Yellen, 2002). Además, al igual que en los canales Kir2.1, el canal  $K_{ATP}$  está regulado por el  $PIP_2$  y otros lípidos de membrana. El  $PIP_2$  interactúa directamente con dos residuos arginina del extremo C-terminal de la subunidad Kir6.2 (R176 y R177), estabilizando el estado abierto del canal y antagonizando la inhibición producida por el ATP (Fan y Makielski, 1997; Lopatin y Nichols, 2001).

Farmacológicamente, la  $I_{K,ATP}$  es inhibida por las sulfonilureas (glibenclamida, glicazida, glipizida, glimepirida, tolbutamida) y por secretagogos de acción rápida como las glinidas (repaglinida, nateglinida) y activada por fármacos como el pinacidilo, la rimakalima, el nicorandil y la cromakalina. Los inhibidores de la  $I_{K,ATP}$  previenen el acortamiento de la DPA y la incidencia de FV durante la isquemia miocárdica (Sanguinetti y Salata, 1996; Grover y Garlid, 2000). Por ello, pueden representar una nueva estrategia terapéutica en pacientes con arritmias ventriculares y enfermedad coronaria. Sin embargo, los canales  $K_{ATP}$  están también presentes en las células  $\beta$  pancreáticas y en el músculo liso, por lo que los bloqueantes de estos canales podrían producir hipoglucemia y vasoconstricción coronaria, efectos que harían disminuir sus ventajas como fármacos antiarrítmicos (Seino y Miki, 2003). Por su parte, los activadores de la  $I_{K,ATP}$  han demostrado efectos cardioprotectores en diversos modelos experimentales miocárdicos de isquemia/reperfusión, así como en pacientes con infarto de miocardio agudo (Sanguinetti y Salata, 1996; Grover y Garlid, 2000). Sin embargo, también producen la activación de los canales  $K_{ATP}$  vasculares (formados por el ensamblaje de las

subunidades Kir6.1 y SUR2B), ocasionándose una respuesta hipotensiva que limita su uso en pacientes con infarto de miocardio (Seino y Miki, 2003). Estos activadores producen además un marcado acortamiento de la DPA, lo que en pacientes con SQT1 disminuye la dispersión transmural de la repolarización y contribuye a suprimir la aparición de pospotenciales precoces y tardíos (Di Diego y Antzelevitch, 1993; Shimizu y cols., 1998).

#### 3.4.1.d. La $I_{K_{ATP}}$ en diversas patologías

La apertura de los canales  $K_{ATP}$  durante la isquemia miocárdica produce un acortamiento en la DPA y una disminución en la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo L. Ambos efectos previenen la sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , preservan los niveles de ATP y aumentan la supervivencia celular (Grover y Garlid, 2000; Gögelein, 2001). La activación de los canales  $K_{ATP}$  juega un papel importante en el fenómeno de preconditionamiento isquémico, de tal forma que los corazones expuestos a breves episodios de isquemia resisten mejor una posterior oclusión coronaria prolongada, reduciendo el tamaño del infarto y la incidencia de arritmias. Por contra, el acortamiento en la DPA, la acumulación de  $K^+$  extracelular, la despolarización de la membrana y la disminución en la velocidad de conducción producidos por la apertura de los canales  $K_{ATP}$  en condiciones de isquemia hacen al miocardio isquémico más sensible a las arritmias por reentrada (Sanguinetti y Salata, 1996). Recientemente, se ha sugerido este efecto en el preconditionamiento isquémico es debido a la activación del canal  $K_{ATP}$  mitocondrial (mito $K_{ATP}$ ), y no a la activación del canal  $K_{ATP}$  situado en el sarcolema (sarc $K_{ATP}$ ) (Grover y Garlid, 2000), ya que los agonistas del mito $K_{ATP}$  reproducen los efectos del preconditionamiento isquémico, mientras que los inhibidores selectivos de estos canales suprimen la cardioprotección inducida en el preconditionamiento isquémico. El hecho de que los canales mito $K_{ATP}$  y sarc $K_{ATP}$  tengan propiedades farmacológicas diferentes plantea la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos que produzcan la apertura selectiva del canal mito $K_{ATP}$ , con lo que se podrían evitar los efectos secundarios hemodinámicos y electrofisiológicos de los activadores de los canales  $K_{ATP}$  de primera generación (no selectivos).

#### 3.4.2. La $I_{K_{ACh}}$

A principios del siglo XX, Otto Loewi estableció el concepto de transmisión sináptica química, tras la descripción de que la liberación de ACh producida tras la estimulación vagal disminuía la frecuencia cardíaca (Loewi, 1921; Loewi y Navaratil, 1926). Sin embargo, hubo

que esperar hasta la mitad de ese siglo para que Del Castillo y Katz describieran la hiperpolarización de la membrana celular inducida por ACh en el corazón de rana (Del Castillo y Katz, 1955). En los años 50, el grupo de Trautwein observó un incremento de la conductancia al  $K^+$  tras la estimulación vagal (Hutter y Trautwein, 1955; Trautwein y Dudel, 1958). Posteriormente, analizaron la cinética de la  $I_K$  inducida por ACh en el nodo SA de conejo y propusieron que la ACh activaba una población específica de canales (a los que llamaron  $K_{ACh}$ ) que enlentecía la actividad marcapasos del nodo SA (Noma y Trautwein, 1978; Osterrieder y cols., 1981).

#### 3.4.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$

La densidad de los canales  $K_{ACh}$  es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA y AV, donde regula la frecuencia cardíaca (Mark y Herlitze, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la  $I_{K,ACh}$  es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002).

La ACh estimula los receptores muscarínicos  $M_2$  y produce la apertura de los canales  $K_{ACh}$  que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoidal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de ms en alcanzar el pico de corriente (Breitwieser y Szabo, 1988). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Qss) (Figura 29A) (Kurachi y cols., 1987a).

La apertura del canal  $K_{ACh}$  inducida tras la estimulación del receptor muscarínico  $M_2$  está mediada por una proteína G heteromérica formada por una proteína  $G_\alpha$  y un dímero  $G_{\beta\gamma}$  (Yamada y cols., 1998). En ausencia de agonistas, la mayor parte de las proteínas  $G_\alpha$  se encuentran unidas al GDP, formando un complejo que posee una alta afinidad por la proteína  $G_{\beta\gamma}$ . La estimulación del receptor muscarínico produce la disociación del complejo  $G_\alpha$ -GDP, lo que permite la formación del complejo  $G_\alpha$ -GTP que, a su vez, promueve la disociación de la proteína  $G_{\beta\gamma}$  de la  $G_\alpha$ . El dímero  $G_{\beta\gamma}$  es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Figura 29D) (Yamada y cols., 1998). Se ha propuesto que la desensibilización a corto plazo del canal está mediada por la transición del receptor muscarínico  $M_2$  desde el estado de alta afinidad hasta el de baja afinidad. Esta transición se debe a la disociación de las proteínas G del receptor tras la aplicación del agonista o por la fosforilación del receptor muscarínico  $M_2$  y la desfosforilación del canal (Yamada y cols., 1998).

La activación de la  $I_{K,ACH}$  hiperpolariza el  $E_m$ , reduce la frecuencia de disparo de las células de los nodos SA y AV y disminuye la velocidad de conducción a través de éste último, efectos que explican por qué la estimulación vagal o la adenosina intravenosa pueden parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004)

#### 3.4.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACH}$

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir3 (Kir3.1 a Kir3.4) en mamíferos y un quinto miembro (Kir3.5) en oocitos de *Xenopus laevis* (Hedin y cols., 1996).

En el corazón humano, los canales que generan la  $I_{K,ACH}$  están formados por las subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que se ensamblan para formar una estructura tetrámerica que presenta una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998). Por el contrario, la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha demostrado que los ratones Kir3.4<sup>-/-</sup> presentan además una disminución de la proteína Kir3.1 y una total ausencia de la  $I_{K,ACH}$  en el corazón (Wickman y cols., 1998).

Estos ratones tenían una frecuencia cardíaca normal en reposo, pero no desarrollaban bradicardia tras la estimulación vagal. Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere la presencia de la subunidad Kir3.4 para translocarse a la membrana celular y formar así el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son responsables de la unión de la proteína  $G_{\beta\gamma}$  al canal, aunque se ha visto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también puede participar en esta unión (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996). La unión de la proteína  $G_\alpha$  al canal parece estar mediada, al menos en parte, por el extremo N-terminal de la Kir3.1 (Huang y cols., 1995).

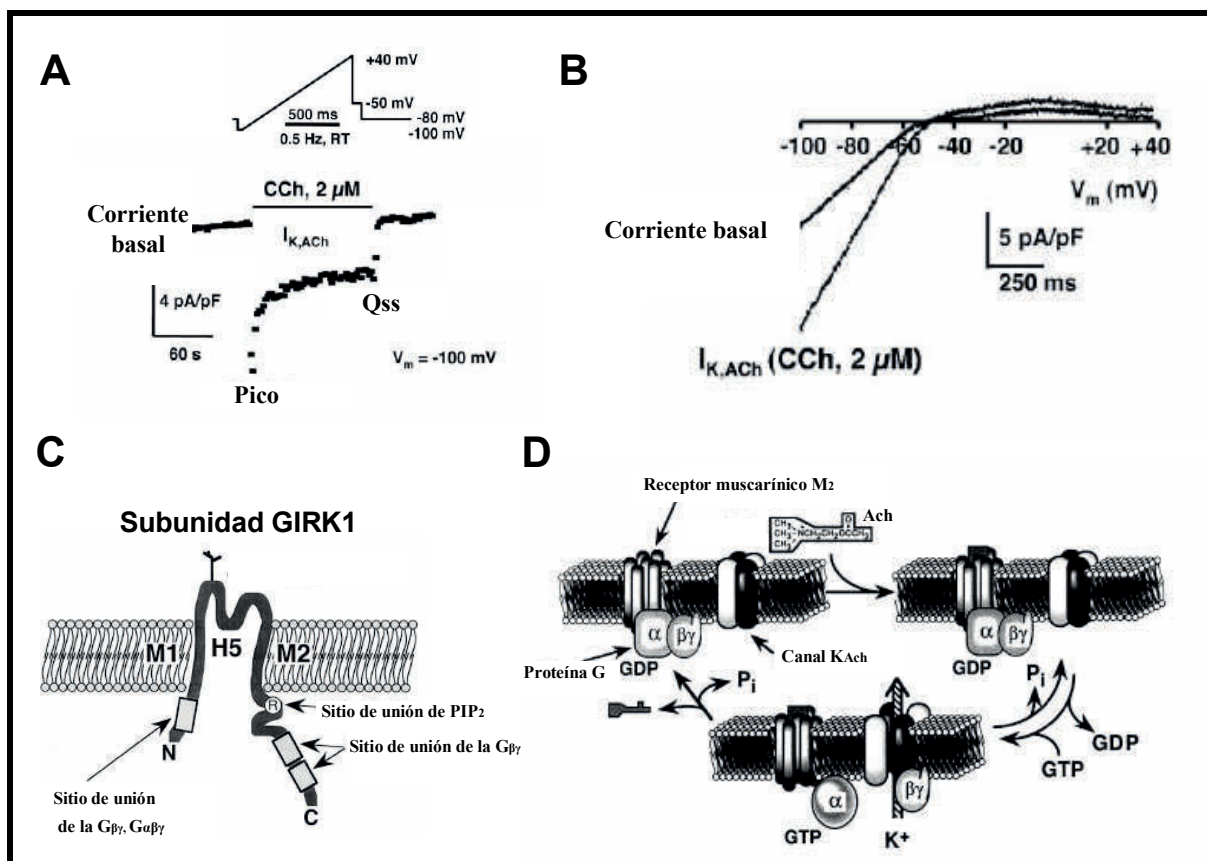
#### 3.4.2.c. Regulación de la $I_{K,ACH}$

La  $I_{K,ACH}$  es estimulada por el ATP intracelular, el  $PIP_2$  y la endotelina A ( $ET_A$ ) e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004).

Para inhibir la  $I_{K,ACH}$  de manera farmacológica se puede actuar tanto a nivel de los receptores muscarínicos  $M_2$  como sobre el propio canal. Así, fármacos como la disopiramida, la procainamida y la pilsicainida bloquean los receptores muscarínicos, mientras que la flecainida y la propafenona actúan sobre el canal en estado abierto (Inomata y cols., 1993).



También se ha demostrado que el bloqueo del canal por la quinidina y el verapamilo es mediado, en parte, por un bloqueo de los receptores muscarínicos (Ito y cols., 1989). Además, tanto el  $Ba^{2+}$  como el  $Cs^{+}$  han demostrado alta eficacia para bloquear los canales de  $K^{+}$  regulados por proteínas G. Estos cationes, cuando se aplican extracelularmente, inhiben la  $I_{K,ACh}$  de manera dependiente de voltaje, con una mayor potencia cuando el  $E_m$  alcanza valores más negativos (Carmeliet y Mubagwa, 1986).



**Figura 29. Características de la  $I_{K,ACh}$  y estructura de los canales  $K_{ACh}$ .** (A) Curso temporal de la  $I_{K,ACh}$  inducida por carbacol (CCh) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. En la actividad de la corriente se alcanza un pico de corriente seguida de una rápida desensibilización en la que se alcanza el Qss. (B) Curva I-V en situación control y tras la aplicación de carbacol (CCh). (C) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2) unidos por el lazo H5 y cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de  $PIP_2$ . (D) Representación esquemática del proceso de activación del canal  $K_{ACh}$  por proteínas G en respuesta a la activación del receptor muscarínico  $M_2$  tras la unión de ACh. [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A-B) y Yamada y cols., 1998 (C-D)]

### 3.4.3. La $I_{K1}$

Hace más de 50 años, cuando la técnica de registro con dos microelectrodos estaba apenas empezando a desarrollarse, uno de sus pioneros, Silvio Weidmann (Weidmann, 1955), demostró que en las fibras de Purkinje del corazón de oveja existía una corriente rectificadora

interna (denominada posteriormente  $I_{K1}$ ) similar a la que Bernard Katz había descrito en músculo esquelético en 1949 (Katz, 1949). Esta corriente presentaba su mayor densidad a voltajes alrededor del potencial de membrana y disminuía con la despolarización de la membrana. Corrientes similares fueron descritas después en trabéculas y músculos papilares de ventrículo de perro (Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970), así como en tejido auricular (Rougier y cols., 1968). A pesar de que estos estudios no profundizaban en el mecanismo de rectificación interna, describían por primera vez las principales características de la  $I_{K1}$ , así como su significado funcional a la hora de estabilizar el PR celular (Hutter y Noble, 1960; Hall y cols., 1963; Noble, 1965; McAllister y Noble, 1966).

A potenciales más negativos que el PR, la  $I_{K1}$  presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del  $E_K$ . Posteriormente, cuando llega el pulso despolarizante, los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV. Por todo ello, la  $I_{K1}$  contribuye también a la parte final de la fase 3 de la repolarización.

#### 3.4.3.a. Rectificación interna y excitabilidad cardíaca

Las especiales características de la rectificación interna que exhiben los canales Kir2 hacen suponer que juega un papel fundamental en la estabilización del PR celular y en la fase final de la repolarización (fase 3) del PA cardíaco, siendo su contribución a la fase de meseta mínima o inexistente. De hecho, Zaritsky y cols. (2000, 2001) han demostrado en ratones Kir2.1<sup>-/-</sup> que la supresión de la  $I_{K1}$  produce un aumento de la actividad espontánea en miocitos ventriculares disociados y una prolongación de la DPA (Zaritsky y cols., 2000 y 2001). De la misma forma, una supresión superior al 90% de la  $I_{K1}$  en ratones transgénicos mediante la transfección de un dominante negativo de Kir2.1 (Kir2.1-AAA, que forma canales no funcionales porque se elimina el filtro de selectividad) produce una prolongación de la DPA y de los intervalos QRS y QT (McLerie y Lopatin, 2003). Sorprendentemente, el PR de los miocitos ventriculares de estos ratones no se modificaba (McLerie y Lopatin, 2003). También se han descrito graves alteraciones cardíacas en corazones de cobayos en los que se suprimía la  $I_{K1}$  mediante la transfección por adenovirus de dominantes negativos Kir2.1-AAA: además de la esperada prolongación del PA, algunos miocitos presentaban actividad marcapasos y, en el 40% de estos animales, los registros del ECG mostraban latidos prematuros de origen ventricular (Miake y cols., 2002 y 2003).

También importante, aunque en cierta forma inesperado, es el hecho de que el aumento de la  $I_{K1}$  en ratones transgénicos ocasionado por la sobreexpresión de Kir2.1 produce múltiples

alteraciones de la excitabilidad cardíaca entre las que se incluyen un acortamiento significativo de la DPA y varios tipos de arritmias auriculares y ventriculares (Li y cols., 2004; Piao y cols., 2007b). Noujaim y cols. (2007) han demostrado que este aumento de la  $I_{K1}$  permite la estabilización de las fuentes de reentrada de alta frecuencia (denominadas rotores), actividad que se suprimía tras la aplicación de concentraciones bajas de  $Ba^{2+}$  (Noujaim y cols., 2007).

Cada vez hay más evidencias de que una excesiva heterogeneidad en la repolarización es un factor que determina la aparición de inestabilidad eléctrica en el corazón, insistiendo en la importancia del papel que juega la  $I_{K1}$  en la estabilidad eléctrica cardíaca. En este sentido, estudios realizados en corazones de cobayo sugieren que el gradiente existente entre la amplitud de la  $I_{K1}$  del ventrículo izquierdo y la del derecho puede contribuir a la estabilización de las arritmias por reentrada en el ventrículo izquierdo (Samie y cols., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que el bloqueo de la  $I_{K1}$  es fundamental para la terminación de arritmias ventriculares inducidas en corazones de animales de esta misma especie (Warren y cols., 2003). Asimismo, experimentos en los que se suprimen/sobreexpresan los canales Kir2.1 en un cultivo en monocapa de cardiomiocitos neonatales de rata han demostrado la importancia de la heterogeneidad de la  $I_{K1}$  en la génesis y mantenimiento de las arritmias (Sekar y cols., 2009).

La marcada e inusual dependencia de la  $[K^+]_e$  que presenta la  $I_{K1}$  es otro de los mecanismos por el que esta corriente participa en la regulación de la excitabilidad cardíaca. La actividad normal del corazón conlleva grandes variaciones de la  $[K^+]_e$  en el reducido espacio intercelular (entre 0.01 y 5  $\mu M$ ) (Kline y Morad, 1976; Kline y cols., 1980). Es más, en las fibras de Purkinje, la  $[K^+]_e$  puede sufrir un aumento transitorio con cada latido hasta alcanzar concentraciones en el rango milimolar (Kline y cols., 1980) e incluso existen regiones o estructuras celulares, como los túbulos T, donde la acumulación de  $K^+$  puede llegar a ser mayor (Almers, 1972; Clark y cols., 2001). El incremento de la  $I_{K1}$  asociado a esos aumentos transitorios de la  $[K^+]_e$  tiene consecuencias en la actividad eléctrica cardíaca, modificando, por ejemplo, la DPA o la propagación del impulso cardíaco (Kline y cols., 1980; Coulombe y Coraboeuf, 1983; Nygren y Giles, 2000).

Se ha descrito que la amplitud de la corriente de salida de la  $I_{K1}$  depende en gran medida de la velocidad con la que se repolariza la membrana (y, consiguientemente, de la repolarización del PA) (Ishihara, 1997; Ishihara y Ehara, 1998). Como se ha mencionado, la unión de las poliaminas y el  $Mg^{2+}$  al canal depende del  $E_m$ , por lo que la velocidad de repolarización de la membrana estaría afectando a las cinéticas de asociación/disociación estos compuestos y, por tanto, a la amplitud de la  $I_{K1}$ .

Por último, a pesar de que está ampliamente descrito el papel de la  $I_{K1}$  en la fase final de la repolarización del PA y su participación en la onda T del ECG, se desconoce qué corriente es la responsable (o si hay más de una corriente) de la aparición de la onda U. Sin embargo, un reciente estudio puede haber contribuido a responder este viejo enigma: el análisis de los ECG de pacientes portadores de diferentes mutaciones en el gen que codifica el canal Kir2.1 ha demostrado que amplitud de la onda U viene determinada por la densidad de la  $I_{K1}$  (Postema y cols., 2009).

#### 3.4.3.b. Localización de la $I_{K1}$

La  $I_{K1}$  presenta una gran densidad en los ventrículos, mientras que su densidad es significativamente menor en las aurículas en todas las especies estudiadas (Shah y cols., 1987; Giles e Imaizumi, 1988; Varro y cols., 1993; Melnyk y cols., 2002; Dhamoon y cols., 2004) excepto en el ratón (Lomax y cols., 2003). Las propiedades de la rectificación de la  $I_{K1}$  también varían entre células ventriculares y auriculares, ya que a potenciales despolarizantes, la corriente de salida de  $K^+$  es prácticamente nula en células auriculares, mientras que en las ventriculares presenta una gran amplitud (Giles e Imaizumi, 1988; Koumi y cols., 1995a). Estas diferencias en la rectificación pueden deberse a que la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  en ambas cámaras sea distinta, a que éstos presenten diferente sensibilidad a las poliaminas, a que las concentraciones intracelulares de poliaminas sean diferentes en aurículas y ventrículos o a una mezcla de todas ellas. La densidad de la  $I_{K1}$  es también diferente entre ventrículos y entre las distintas regiones de un mismo ventrículo. De manera general, la  $I_{K1}$  es mayor en el ventrículo derecho que en el izquierdo (Brunet y cols., 2004; Panama y cols., 2007), aunque existen excepciones como el cobayo, donde es justo al contrario (izquierdo > derecho) (Warren y cols., 2003). En el ventrículo izquierdo del ratón, la densidad de la  $I_{K1}$  es mayor en miocitos apicales que en miocitos epicárdicos (Brunet y cols., 2004), mientras que en el ventrículo izquierdo de gato, la  $I_{K1}$  es mayor en las células endocárdicas que en las epicárdicas (Furukawa y cols., 1992).

La densidad de la  $I_{K1}$  es pequeña en las células del nodo SA de ratón y de rata (Shinagawa y cols., 2000; Cho y cols., 2003) e indetectable en las mismas células de conejo (Shinagawa y cols., 2000). La menor presencia de la  $I_{K1}$  en las células del nodo SA permite mantener un PR relativamente despolarizado ( $\approx -50$  mV) en comparación con el de las células ventriculares ( $\approx -80$  mV), donde la  $I_{K1}$  presenta una mayor densidad (Schram y cols., 2002). La ausencia de la  $I_{K1}$  en células del nodo AV de conejo (Kokubun y cols., 1982; Munk y cols., 1996) contrasta con la gran  $I_{K1}$  registrada en células del nodo AV de cobayo (Yuill y Hancox, 2002).

En prácticamente todos los tipos celulares cardíacos en los que se ha registrado la  $I_{K1}$ , se ha identificado la presencia de canales Kir en la membrana externa del sarcolema (Anumonwo y Lopatin, 2010). La presencia de dichos canales en la membrana de los túbulos T es indiscutible, ya que la pérdida de los túbulos T que se produce a corto plazo en miocitos en cultivo se acompaña de una reducción significativa de la  $I_{K1}$  (Lipp y cols., 1996; Mitcheson y cols., 1996; Christie, 1999). Estos resultados se han visto confirmados además mediante experimentos en los que se estudia el efecto de la acumulación/depleción de  $K^+$  en los túbulos T sobre la corriente. Clark y cols. (2001) han demostrado que en miocitos ventriculares de ratón se produce un aumento significativo de las corrientes de cierre de la  $I_{K1}$  en respuesta a un gran flujo de salida de iones  $K^+$  previo (con el consiguiente aumento de la  $[K^+]_e$ ), lo que es consistente tanto con la acumulación de  $K^+$  en el espacio intercelular como con la localización de la  $I_{K1}$  en el restringido espacio de los túbulos T (Clark y cols., 2001). Además, el marcaje mediante anticuerpos específicos para Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 demuestra la localización de éstos en los túbulos T de los miocitos ventriculares (Clark y cols., 2001; Leonoudakis y cols., 2001; Melnyk y cols., 2002). Otros experimentos han demostrado una gran expresión de Kir2.3 (comparada con Kir2.1) en las membranas de los discos intercalares de miocitos auriculares y ventriculares de perro (Melnyk y cols., 2002).

La localización intracelular de los canales Kir2 esta mediada por secuencias de aminoácidos contenidas en el dominio citoplasmático (Ma y cols., 2001; Hibino y cols., 2010). La secuencia de exportación del retículo endoplasmático es F-C-Y-E-N-E y probablemente sea distinta a la de otros canales Kir (Ma y cols., 2001; Stockklausner y cols., 2001). Del retículo endoplasmático los canales pasan al aparato de Golgi y la exportación desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática depende mayoritariamente de dos grupos de residuos del dominio citoplasmático: R44/R46 del N-terminal y una secuencia de 4 aminoácidos empezando por Y242. En Kir2.1, las mutaciones en estos aminoácidos provocan la retención de los canales en el aparato de Golgi (Stockklausner y Klocker, 2003; Hofherr y cols., 2005). Sin embargo, el tráfico de los canales a la membrana celular es un proceso multifactorial, dado que se han descrito mutaciones de pérdida de función en Kir2.1 (V302M, delección de S95-F98 en el dominio transmembrana y delección de S314-Y315 en el dominio citoplasmático) que provocan la retención de Kir2.1 en la membrana plasmática (Plaster y cols., 2001; Tristani-Firouzi y cols., 2002; Bendahhou y cols., 2003). Estas mutaciones podrían estar interfiriendo directamente en la localización en la membrana o estar provocando defectos en el plegamiento implicados en los mecanismos de retención y degradación. La regulación del tráfico de los canales Kir2 no es, por tanto, un asunto trivial dado que mutaciones de pérdida de función podrían ser rescatadas forzando la expresión de los canales.

### 3.4.3.c. Composición de los canales que generan la $I_{K1}$

Aunque está ampliamente demostrado que los miembros de la subfamilia Kir2 son los responsables de la  $I_{K1}$  cardíaca, la composición exacta de los canales que generan esta corriente varía según la especie y el tipo celular estudiado (Kubo y cols., 2005). También depende de la localización en la membrana de dichos canales. Un estudio reciente ha proporcionado un detallado patrón de la expresión de los diferentes miembros de la subfamilia Kir2 (excepto Kir2.4) en las aurículas, en el epicardio y el endocardio de los ventrículos y en las fibras de Purkinje del miocardio humano (Gaborit y cols., 2007). No se han encontrado diferencias significativas entre epicardio y endocardio ventricular ni entre las cámaras izquierda y derecha. En cambio, sí se han encontrado diferencias en la expresión de las diferentes subunidades Kir2 en las fibras de Purkinje (Kir2.1 ~ Kir2.3 > Kir2.2), en el ventrículo derecho (Kir2.1 >> Kir2.2 > Kir2.3) y en la aurícula derecha (Kir2.3 > Kir2.2 > Kir2.1) (Gaborit y cols., 2007). Sin embargo, estos resultados contradicen los obtenidos en un estudio anterior (Wang y cols., 1998).

En el corazón de cobayo, se ha demostrado la presencia de estas tres subunidades Kir2 (Kir2.1 > Kir2.2 ~ Kir2.3). También se detectaba la presencia de Kir2.4, aunque el marcaje mediante anticuerpos específicos demostró que su expresión se restringía a las células neuronales presentes en el corazón (Liu y cols., 2001). Los datos sobre la presencia de Kir2.2 en el corazón de cobayo también son controvertidos, ya que un estudio posterior no consiguió detectar su presencia (Dhamoon y cols., 2004). Tampoco se detectaba la presencia de Kir2.2 en miocitos auriculares y ventriculares de oveja (Dhamoon y cols., 2004). Por último, Kir2.1 es la subunidad Kir2 más abundante en corazones de ratón (Kir2.1 > Kir2.2 >> Kir2.3) (Zaritsky y cols., 2001).

Para averiguar la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  se han llevado a cabo diferentes aproximaciones. En primer lugar, Nakamura y cols. (1998) usaron AsODN contra el ARNm de Kir2.1 en miocitos ventriculares de rata, consiguiendo que la  $I_{K1}$  se viera drásticamente reducida y que la frecuencia de aparición de la conductancia de 21 pS disminuyera significativamente, sin afectar al resto de conductancias (Nakamura y cols., 1998). Estos resultados sugieren que hay diferentes subtipos de canales que pueden contribuir a generar la  $I_{K1}$  y que, aunque los canales Kir2.1 sean los mayoritarios, tiene que investigarse la contribución del resto de miembros de esta familia. En segundo lugar, Zaritsky y cols. (2000) han utilizado ratones en los que se ablacionan los genes que codifican las proteínas Kir2.1 y Kir2.2 (Zaritsky y cols., 2000). A pesar de que apenas sobreviven unas horas tras su

nacimiento, los miocitos ventriculares de los ratones Kir2.1<sup>-/-</sup> carecen de  $I_{K1}$ , demostrando que los canales Kir2.1 son esenciales para la generación de la corriente en estos miocitos. Sin embargo, los ratones Kir2.2<sup>-/-</sup> sí presentan la  $I_{K1}$ , aunque ésta se encuentra reducida en  $\approx 50\%$  (Zaritsky y cols., 2000), lo que demuestra también la participación de estos canales.

También se ha tratado de averiguar la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades como la conductancia, la sensibilidad al Ba<sup>2+</sup> y al pH o la cinética de activación. En miocitos auriculares y ventriculares, se han registrado corrientes unitarias que presentaban conductancias que iban desde los  $\approx 10-15$  pS (correspondientes a canales Kir2.3) hasta los  $\approx 40-45$  pS (correspondientes a canales Kir2.2), pasando por conductancias intermedias ( $\approx 21-28$  pS, correspondientes a canales Kir2.1) (Sakmann y Trube, 1984a; Matsuda, 1988; Burnashev y Zilberter, 1986; Wible y cols., 1995; Liu y cols., 2001). Sin embargo, la frecuencia con la que se detectan dichas conductancias depende de la especie y del tejido estudiado, por lo que la contribución exacta de cada uno de los Kir2.x a los heterotetrámeros que forman el canal sigue siendo un misterio. La sensibilidad al Ba<sup>2+</sup> también es distinta para los diferentes canales Kir2.x. Por ejemplo, Schram y cols. (2003) han demostrado que la sensibilidad al Ba<sup>2+</sup> de los canales Kir2.1+Kir2.3 es mayor a la que presentan cada uno de ellos por separado y similar a la que presentan los canales Kir2.2, pero diferente a la que presenta la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares humanos, lo que confirma la participación de varias subunidades  $\alpha$  Kir2.x diferentes en la generación de la  $I_{K1}$  humana (Schram y cols., 2003).

Por último, los canales Kir2.x también se diferencian en su cinética activación (Figura 30). Se ha demostrado que la cinética de los canales Kir2.1+Kir2.3 es proporcional al número de subunidades Kir2.3 que forman parte del canal (Panama y cols., 2007). Analizando la cinética de activación de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos de ratón y de cobayo se ha sugerido que la participación de los canales Kir2.3 en la corriente en dichos animales es minoritaria (Yan y cols., 2005; Panama y cols., 2007). Por el contrario, el estudio de la sensibilidad al pH de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de oveja ha demostrado una gran contribución de los canales Kir2.3 a la corriente en dichos miocitos (Tabla 15) (Muñoz y cols., 2007).

#### 3.4.3.d. Propiedades de los canales Kir2.x

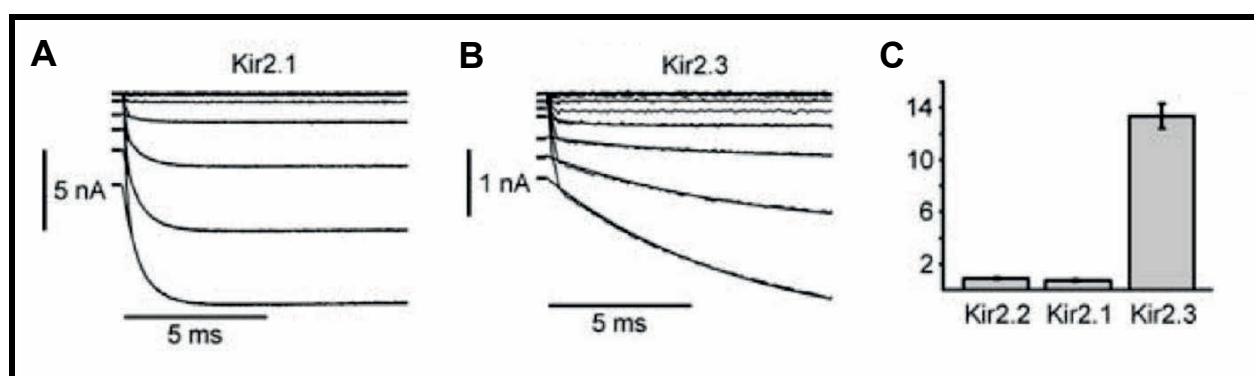
Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir2.x (Kir2.1 a Kir2.4) en mamíferos, aunque la expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (solamente se

ha demostrado su presencia en las células nerviosas que inervan el miocardio) y parece localizarse preferentemente en el SNC (Liu y cols., 2001), lo que señala a los otros tres miembros de la familia como los canales responsables de la  $I_{K1}$ . Además, se ha clonado un quinto miembro de la familia Kir2 en peces (Kir2.5) (Hassinen y cols., 2008).

Subunidad	Conductancia (pS)	Sensibilidad al $Ba^{2+}$	Sensibilidad al pH extracelular	Sensibilidad al pH intracelular
Kir2.1	20-31	++	-	+
Kir2.2	34-42	+++	-	+
Kir2.3	10-14	+	+++	+++
Kir2.4	≈15	+	+++	?

**Tabla 15. Propiedades de los canales Kir2.x expresados en sistemas heterólogos.** La diferencia en la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  y al pH entre los canales Kir2.x va desde los muy sensibles (+++) hasta los poco (+) o nada (-) sensibles. La sensibilidad de Kir2.4 al pH intracelular no ha sido determinada experimentalmente todavía.

Los miembros de la subfamilia Kir2 presentan diferentes características cuando son estudiados en sistemas heterólogos de expresión (Tabla 15). Las 4 subunidades Kir2.x presentan conductancias distintas (Kubo y cols., 1993a; Morishige y cols., 1993; Makhina y cols., 1994; Morishige y cols., 1994; Périer y cols., 1994; Raab-Graham y cols., 1994; Takahasi y cols., 1994; Wible y cols., 1995; Töpert y cols., 1998; Choe y cols., 2000; Liu y cols., 2001) y diferencias en la sensibilidad al  $Ba^{2+}$ , un potente bloqueante selectivo de canales rectificadores (Liu y cols., 2001; Preisig-Müller y cols., 2002; Schram y cols., 2003), y al pH intracelular (Qu y cols., 2000; Collins y Larson, 2002) y extracelular (Hughes y cols., 2000; Yan y cols., 2005; Muñoz y cols., 2007).



**Figura 30. Cinética de activación de los canales Kir2.** (A-B) Trazos representativos de corrientes generadas por los canales Kir2.1 (A) y Kir2.3 (B) registrados al aplicar pulsos entre -130 y -30 mV desde un potencial de fijación de -30 mV. Los ajustes a una función exponencial para obtener la constante cinética de la activación ( $\tau_{act}$ ) se muestran superpuestos a los trazos de corriente. (C) Comparación de las  $\tau_{act}$  de los diferentes canales Kir2 a -115 mV. [Adaptadas de Panama y Lopatin, 2006]



Las subunidades Kir2.x presentan también diferentes cinéticas de activación (Figura 30). La apertura de los canales Kir cardíacos tras la hiperpolarización de la membrana se caracteriza por una fase casi instantánea (activación) seguida de una ligera caída de la corriente dependiente del tiempo producida por cationes extracelulares (ver más adelante). La amplitud de ambas fases depende del tipo de canal y de las condiciones experimentales empleadas, pero, en general, la cinética de activación viene determinada principalmente por la cinética de disociación de las poliaminas (y, mayoritariamente, de la espermina) de su sitio de unión en el canal, además de depender en gran medida del  $E_m$  y de la  $[K^+]_e$ . La constante cinética de activación ( $\tau_{act}$ ) es similar en los canales Kir2.1 y Kir2.2 ( $\approx 0.5-2$  ms), mientras que es  $\approx 7-9$  veces más lenta en los canales Kir2.3 (Figura 31) (Panama y Lopatin, 2006; Panama y cols., 2007).

#### 3.4.3.e. Regulación de la $I_{K1}$

- Modulación por cationes ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ )

En experimentos de fijación de voltaje se ha observado que la amplitud de la  $I_{K1}$  disminuye tras la aplicación mantenida de un pulso hiperpolarizante (Maughan, 1976; Baumgarten y cols., 1977; Sakmann y Trube, 1984b) fenómeno debido mayoritariamente al bloqueo dependiente de voltaje producido por cationes extracelulares (Biermans y cols., 1987), siendo el  $Na^+$  el principal ion implicado en dicho proceso en músculo cardíaco y esquelético (Standen y Stanfield, 1979). A pesar de que los cationes divalentes como el  $Ca^{2+}$  o el  $Mg^{2+}$  son también potentes bloqueantes de la  $I_{K1}$  en el corazón, el hecho de que las concentraciones de  $K^+$  en el rango de potenciales por debajo del  $E_K$  estén en el orden de milimolar hacen que su bloqueo sea muy débil y que su cinética de unión sea mucho más lenta que la del  $Na^+$  (Biermans y cols., 1987). En miocitos ventriculares de cobayo, la eliminación de los iones  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  del medio extracelular hace desaparecer de forma casi completa la disminución de la  $I_{K1}$  dependiente del tiempo (Sakmann y Trube, 1984b; Shieh, 2000).

El  $Ca^{2+}$  intracelular produce una inhibición dependiente de voltaje de la  $I_{K1}$  (Matsuda y Cruz, 1993). Aunque el  $Ca^{2+}$  es un inhibidor menos potente que el  $Mg^{2+}$  y sus concentraciones medias intracelulares son bastante bajas, hay bastantes evidencias de que la  $[Ca^{2+}]_i$  pueden tener efectos dinámicos sobre la  $I_{K1}$ . Por ejemplo, los aumentos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_i$  que tienen lugar durante el PA producen la inhibición de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de cobayo (Zaza y cols., 1998). Estos resultados sugieren que los canales que generan la  $I_{K1}$  se

localizan en espacios como los túbulos T, regiones restringidas y próximas a los lugares en los que se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo.

Los iones  $\text{Ba}^{2+}$  son bloqueantes de la  $I_{\text{K1}}$  más potentes que el resto de los cationes divalentes (DiFrancesco y cols., 1984) y, de hecho, el bloqueo producido por iones  $\text{Ba}^{2+}$  extracelulares a potenciales hiperpolarizantes se considera una de las características que definen a las corrientes rectificadoras internas, por lo que ha sido ampliamente utilizado para caracterizar los nuevos canales clonados como miembros de la familia Kir. Como se ha mencionado, cada una de las subunidades Kir2.x posee diferente sensibilidad al  $\text{Ba}^{2+}$  (Tabla 15) (Liu y cols., 2001; Preisig-Müller y cols., 2002; Schram y cols., 2003).

- Estimulación adrenérgica

En general, está ampliamente aceptado que tanto la estimulación adrenérgica  $\alpha$  (Fedida y cols., 1991; Braun y cols., 1992) como la  $\beta$  (Koumi y cols., 1995b; González de la Fuente y cols., 2013) producen una reducción de la  $I_{\text{K1}}$ , aunque también hay resultados en sentido contrario (Gorostiza y cols., 1995). A esta variedad en los resultados hay que añadir la coexistencia de diferentes tipos de receptores adrenérgicos en el corazón. Por ejemplo, en oocitos de *Xenopus laevis*, la estimulación de receptores  $\beta_3$  produce el aumento de las corrientes generadas por los canales Kir2.1 (mediado por PKC) y Kir2.2 (mediado por PKA), aunque no en la generada por los canales Kir2.3 (Scherer y cols., 2007), mientras que la estimulación de receptores  $\alpha_{1A}$  produce la inhibición de las corrientes generadas por los canales Kir2.2 y Kir2.3, pero no en la generada por los canales Kir2.1 (Zitron y cols., 2008).

- Modulación por poliaminas

Las concentraciones celulares de poliaminas se regulan por un complejo sistema de enzimas (Seiler, 1994) que dan lugar a niveles de poliaminas libres que son suficientes para producir la rectificación interna de los canales Kir que se ha observado experimentalmente. La concentración citoplásmica de cada poliamina está regulada para que cada una de ellas juegue un papel específico en la función de los canales (Lopatin y cols., 1995), por lo que sus niveles se ajustan de forma dinámica para producir la rectificación en el rango fisiológico en el que se mueven los potenciales de membrana.

Aunque no hay evidencias de que las poliaminas jueguen un papel importante en las respuestas fisiológicas en las que está implicada la  $I_{\text{K1}}$ , sí se ha demostrado que la manipulación de las concentraciones de poliaminas pueden modular las corrientes generadas por canales Kir2.x (Bianchi y cols., 1996; Shyng y cols., 1996; Lopatin y cols., 2000). Por

ejemplo, Bianchi y cols. (1996) han demostrado en basófilos de rata que la rectificación interna se atenuaba tras un tratamiento con un inhibidor específico de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), ya que este inhibidor producía el aumento de las concentraciones de putrescina y la disminución de las concentraciones de espermidina y espermina (Bianchi y cols., 1996). Asimismo, ratones transgénicos en los que se elimina el gen de la espermina sintasa presentan una  $I_{K1}$  con una menor rectificación y cinéticas de activación más rápidas, a la vez que unos niveles indetectables de espermina y un aumento de 5 veces en los niveles de espermidina (Lopatin y cols., 2000). Sin embargo, la sobreexpresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en corazones de ratón, a pesar de que producía un aumento en su actividad y de que se incrementaban los niveles intracelulares de putrescina en más del 35%, apenas ocasionaba un ligero aumento de la amplitud de la  $I_{K1}$ , lo que sugiere que la putrescina juega un papel poco importante en la regulación de la  $I_{K1}$  (Lopatin y cols., 2000). Por el contrario, se ha demostrado que la eliminación de la putrescina intracelular sí afecta a la rectificación de los canales Kir2.3 (Shyng y cols., 1996), mientras que la eliminación de la putrescina del medio extracelular lleva a la depleción de sus niveles intracelulares, así como de los de espermidina y espermina, produciendo también modificaciones en las características cinéticas de Kir2.3 (Lopatin y cols., 1995).

- Modulación por pH

La sensibilidad al pH de la  $I_{K1}$  depende del tejido y de la especie estudiada, posiblemente debido a la diferente composición de los canales que la generan (Tabla 15). En miocitos ventriculares de rata y cobayo, la  $I_{K1}$  es insensible a la  $[H^+]_i$  (Ito y cols., 1992; Komukai y cols., 2002a y 2002b). Por el contrario, la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de oveja es inhibida por  $[H^+]_i$  que se encuentran en el rango fisiológico ( $pK_a=7.4$ ) (Muñoz y cols., 2007). Estos resultados son consistentes con una importante contribución de los canales Kir2.3 a la  $I_{K1}$  en estos miocitos (Dhamoon y cols., 2004), ya que los canales Kir2.3 son los más sensibles a la  $[H^+]_i$  que los Kir2.1 (Tabla 15) (Yan y cols., 2005). De hecho, se ha descrito que son las subunidades Kir2.3 las que confieren sensibilidad al pH a los heterotetrámeros Kir2.1+Kir2.3 (Muñoz y cols., 2007). Además, se ha identificado a la treonina en posición 53 como el residuo responsable de la sensibilidad al pH en los canales Kir2.3 (Qu y cols., 2000).

Los canales Kir1.1 (homólogos de Kir2.1, pero con una rectificación interna más débil) son sensibles a las  $[H^+]_i$  que se encuentran en el rango fisiológico (Tsai y cols., 1995). La gran sensibilidad del canal Kir1.1 a los cambios en el pH está relacionada con la presencia de una lisina en la posición 80 (Fakler y cols., 1996b), ya que la neutralización de este residuo tiene como resultado la pérdida de sensibilidad al pH intracelular. Por otro lado, la sustitución del

residuo homólogo en Kir2.1 por una lisina (M84K) hace que este canal adquiriera sensibilidad al pH intracelular (Fakler y cols., 1996b), lo que indica que, a pesar de que este canal no presente especial sensibilidad al pH intracelular, los requerimientos estructurales necesarios para ello están claramente presentes. Por lo tanto, no es de extrañar que los canales que se forman tras el ensamblaje de subunidades Kir2.1 con otros miembros de la familia Kir2 sensibles al pH (p.e., Kir2.3) sí que presenten sensibilidad al pH (Muñoz y cols., 2007).

- Modulación por PIP<sub>2</sub>

El PIP<sub>2</sub> es un importante segundo mensajero de una gran variedad de vías de señalización (Hilgemann, 1997; Hilgemann y cols., 2001). La primera corriente con rectificación interna que se demostró que era modulada por el PIP<sub>2</sub> fue la  $I_{K,ATP}$  (Hilgemann y Ball, 1996) y, desde entonces, se ha descrito que el PIP<sub>2</sub> es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007).

El PIP<sub>2</sub> produce la apertura de los canales Kir, mientras que su depleción produce el cierre de los mismos (Huang y cols., 1998; Shyng y cols., 2000; Lopes y cols., 2002; Rohacs y cols., 2003; Logothetis y cols., 2007). En este sentido, Rohacs y cols. (1999) han demostrado que el PIP<sub>2</sub> es un potente activador de los canales Kir2.1, mientras que su modulación de otros canales Kir (como los canales Kir3.1 o Kir3.4) es más débil. Además, se ha demostrado la importancia de la localización de los dos grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 de la molécula de PIP<sub>2</sub>, ya que el cambio de posición o la eliminación de estos sustituyentes disminuye la afinidad de estos compuestos por los canales Kir2.1 (Rohacs y cols., 1999). El PIP<sub>2</sub> también afecta a las propiedades de cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2. Por ejemplo, se ha demostrado que la modulación de los canales Kir2.3 por el pH, la acetilcolina o el miristato-acetato de forbol (PMA, *Phorbol Myristate Acetate*) depende de las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal (Logothetis y cols., 2007).

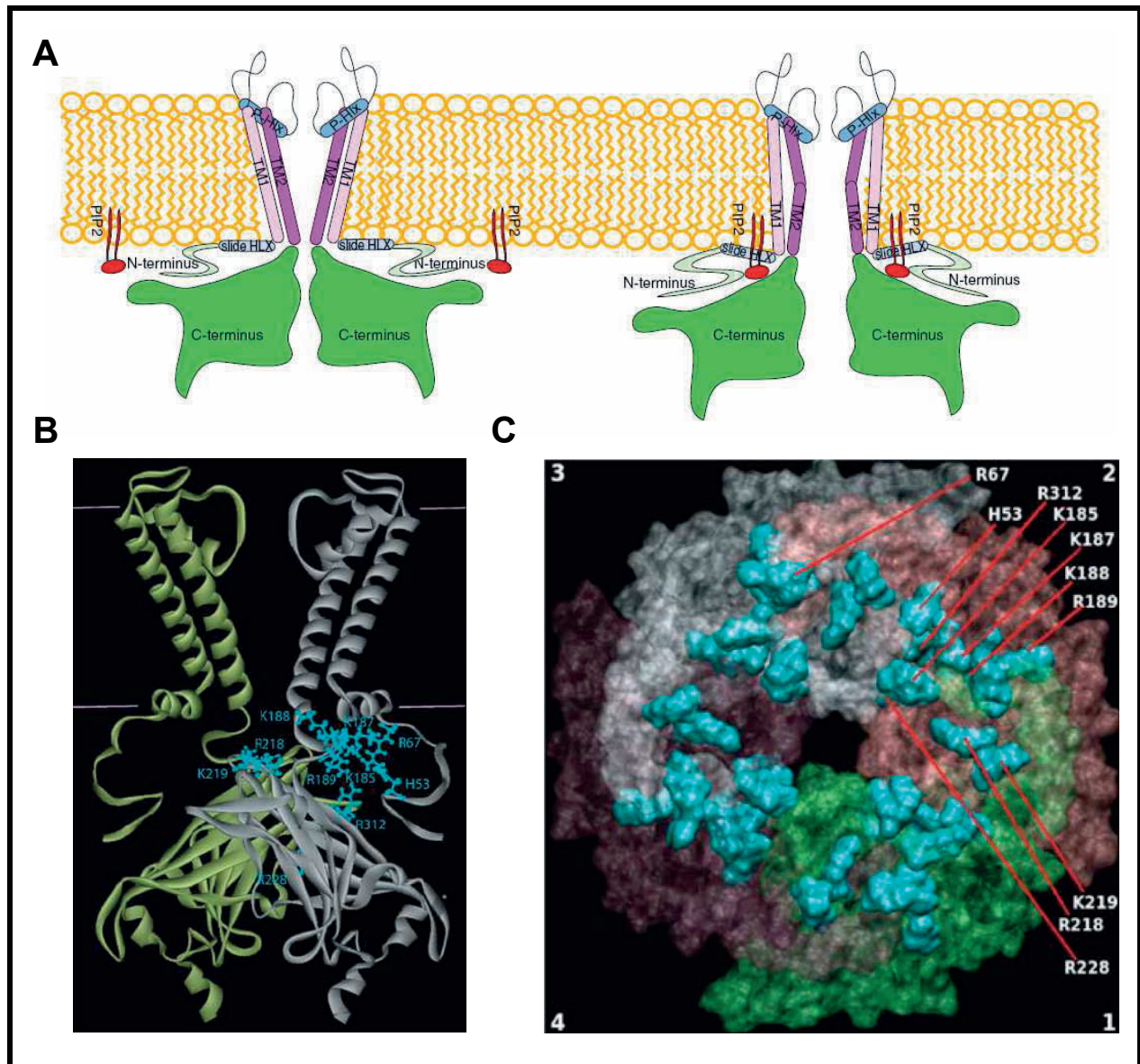
Se han identificado numerosos residuos implicados en la modulación de los canales Kir2 por el PIP<sub>2</sub>, la mayoría de ellos localizados en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Figuras 31B y C) (Lopes y cols., 2002; Decher y cols., 2007; Logothetis y cols., 2007). Recientemente, Hansen y cols. (2011) cristalizaron Kir2.2 junto con PIP<sub>2</sub> y observaron que éste último interaccionaba con el canal a través de sus dos grupos acilo y el grupo glicerol con la secuencia R-W-R (posiciones 78-80) del dominio transmembrana y con el grupo inositol con la secuencia K-P-K-K (posiciones 186-190) del dominio citoplasmático (Hansen y cols., 2011). Esto hace que el dominio citoplasmático se aproxime 6 Å hacia el dominio

transmembrana, provocando además cambios conformacionales que fuerzan la apertura del canal, en consonancia con lo descrito en trabajos anteriores (Figura 31A) (Logothetis y cols., 2007). Además, se ha demostrado que las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura de los mismos, favoreciendo la estabilización del canal en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008). Se ha propuesto que las poliaminas actúan como cofactores en esta activación de los canales de Kir2.1 mediada por PIP<sub>2</sub>. De hecho, la espermina es capaz de estabilizar los canales en configuración abierta, permitiendo un aumento aparente de la afinidad de la unión del PIP<sub>2</sub> con el canal (Xie y cols., 2005).

#### 3.4.3.f. La $I_{K1}$ en diversas patologías

La  $I_{K1}$  auricular está aumentada en pacientes con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1997; Dobrev y cols., 2002, Gonzalez de la Fuente y cols., 2012). En la insuficiencia cardíaca congestiva se han descrito efectos contradictorios tanto en miocitos auriculares como ventriculares. Concretamente, en miocitos ventriculares, se ha descrito un ligero aumento (Beuckelmann y cols., 1993; Pogwizd y cols., 2001; Fauconnier y cols., 2005) o ningún cambio (Rozanski y cols., 1997; Tsuji y cols., 2000). Por el contrario, en miocitos auriculares, se ha descrito una disminución de la  $I_{K1}$  (Koumi y cols., 1994), aunque no se ve modificada en un modelo canino de insuficiencia cardíaca (Li y cols., 2000).

Muchos estudios han demostrado que la amplitud de la  $I_{K1}$ , así como la de otras corrientes de K<sup>+</sup>, se encuentra reducida en animales espontáneamente hipertensos y en modelos animales de hipertrofia cardíaca (Brooksby y cols., 1993; McIntosh y cols., 1998; Näbauer y Kääh, 1998; Mitarai y cols., 2000). A este respecto, es importante resaltar que numerosos trabajos han demostrado además que la hipertrofia cardíaca aumenta las concentraciones de poliaminas (Caldarera y cols., 1974; Bartolome y cols., 1980), sugiriendo la posibilidad de que la reducción de la  $I_{K1}$  sea consecuencia de las aumentadas concentraciones intracelulares de poliaminas. Sin embargo, en un modelo de hipertrofia ventricular en gatos, la  $I_{K1}$  está aumentada en miocitos de ventrículo derecho (Kleiman y Houser, 1989), mientras no se modifica en miocitos de ventrículo izquierdo (Furukawa y cols., 1993).



**Figura 31. Modulación de los canales Kir2 por el PIP<sub>2</sub>.** (A) Representación esquemática de los efectos del PIP<sub>2</sub> sobre el gating del canal. A la izquierda, se muestra el canal en estado cerrado antes de la interacción con el PIP<sub>2</sub>. A la derecha, el canal en estado abierto después de interactuar con el PIP<sub>2</sub>. (B) Localización de algunos de los residuos sensibles a PIP<sub>2</sub> (en azul) sobre un modelo de la estructura del canal Kir2.1 (realizado a partir del dominio citoplásmico del canal Kir2.1 y los segmentos TM del canal KirBac3.1). (C) Vista superior del dominio citoplásmico del canal Kir2.1 con la localización de algunos de los residuos sensibles a PIP<sub>2</sub> (en azul). Las diferentes subunidades Kir2.1 aparecen en distintos colores y numeradas del 1 al 4. [Adaptadas de Logothetis y cols., 2007]

Los miocitos ventriculares humanos de regiones que sufren isquemia crónica presentan un PR más despolarizado y sufren la prolongación de la DPA, especialmente en la fase final de la repolarización (Mubagwa y cols., 1994), lo que concuerda con la reducción de la  $I_{K1}$  que se produce en el corazón tras un infarto de miocardio (Lue y Boyden, 1992; Beuckelmann y cols., 1993; Pinto y Boyden, 1998). Durante el estrés metabólico (p.e., durante la isquemia), el marcado aumento de la  $I_{K,ATP}$  enmascara muchos de los efectos que ocurren en otras corrientes de  $K^+$  como la  $I_{K1}$ . Sin embargo, utilizando glibenclamida como inhibidor de la

$I_{K,ATP}$ , Xie y cols. (1997) han demostrado que la presencia de iodacetamida como inductor de estrés metabólico produce una inhibición de la  $I_{K1}$  (Xie y cols., 1997). Además, la supresión de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de conejo elimina la protección frente al estrés metabólico que produce el preconditionamiento isquémico, un papel que clásicamente se había asignado a la  $I_{K,ATP}$  (Díaz y cols., 2004). Por último, diversos estudios sugieren que la  $I_{K1}$  está aumentada en condiciones de hipoxia/anoxia (Ruíz-Perich y cols., 1991) o en presencia de cianida (Muramatsu y cols., 1990). De hecho, un trabajo reciente ha demostrado que el acortamiento del PA que se produce en la fase aguda de la hipoxia está mediado por la  $I_{K1}$  y no por la  $I_{K,ATP}$  (Piao y cols., 2007a).

Por último, es importante resaltar que la modulación de la relación I-V por la  $[K^+]_e$  no sólo es una característica biofísica sino que tiene implicaciones fisiopatológicas, ya que la  $[K^+]_e$  se eleva durante los episodios isquémicos o en presencia de taquiarritmias como resultado de una acumulación de iones  $K^+$  en los espacios intercelulares y en las proximidades de los túbulos T (Sejersted y Sjogaard, 2000).

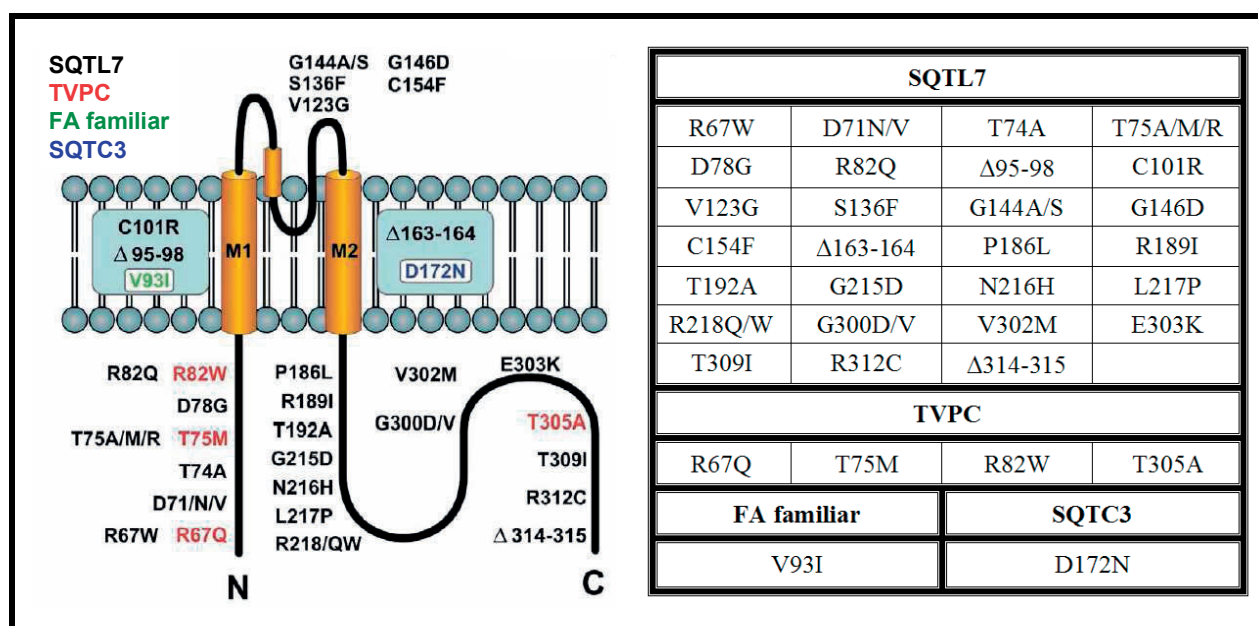
#### 3.4.3.g. Canalopatías asociadas a los canales Kir2.1

Hasta la fecha, se han descrito 4 tipos de canalopatías asociadas a canales Kir, todas ellas en el gen que codifica las subunidades Kir2.1 (KCNJ2): el síndrome de Andersen (SQTL7), el SQTC3, la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC) y la FA familiar (Figura 32).

- Síndrome de QT largo

El SQTL7 (asociado a alteraciones de la función de la  $I_{K1}$ ) se relaciona con el síndrome de Andersen-Tawil (SAT), que se caracteriza por un fenotipo clínico en el que se ven afectadas tanto la morfogénesis como la funcionalidad de los músculos esqueléticos y cardíacos. El SAT es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por parálisis periódicas y diferentes alteraciones multiorgánicas entre las que se encuentran la escoliosis, el paladar hendido, baja estatura y debilidad muscular (Plaster y cols., 2001; Donaldson y cols., 2003; Terzic y cols., 2008). Las alteraciones en la actividad eléctrica cardíaca incluyen cortos períodos de taquicardia ventricular y la aparición de múltiples focos ectópicos ventriculares tras estimulación adrenérgica, así como la mencionada prolongación del intervalo QT. Sin embargo, Zhang y cols. (2005) han sugerido que la clasificación del SAT como SQTL7 podría no ser del todo correcta, ya que las modificaciones en el ECG características del SAT están más relacionadas con alteraciones del complejo T-U (Zhang y cols., 2005). Un amplio estudio genético realizado para identificar el gen implicado en el SAT lo ha relacionado con el

brazo largo del cromosoma 17, precisamente donde se localiza el *locus* del gen *KCNJ2* (*Kir2.1*), por lo que se buscaron posibles mutaciones en este gen. Este estudio demostró que más de la mitad de los pacientes con SAT presentaban mutaciones en el gen *KCNJ2* (Plaster y cols., 2001), por lo que se denomina como tipo 1 (SAT1) al síndrome de Andersen en el que están afectados los canales *Kir2.1* (Plaster y cols., 2001; Andelfinger y cols., 2002; Schulze-Bahr, 2005; Zhang y cols., 2005).



**Figura 32. Mutaciones en la subunidad *Kir2.1* asociadas con canalopatías.** En el dibujo, las diferentes mutaciones siguen el siguiente código de color: negro para el SQTL7, rojo para el TVPC, verde para la FA familiar y azul para el SQTC3. [Adaptada de Anumonwo y Lopatin, 2010]

Se han identificado más de 33 mutaciones en el gen *KCNJ2* relacionadas con el SAT1 (Figura 33), todas ellas caracterizadas por la pérdida de función del canal *Kir2.1*, lo que origina la prolongación del intervalo QT y predispone al paciente a sufrir arritmias cardíacas. Debido a que el SAT1 es un trastorno autosómico dominante (un alelo mutado y otro sano), Plaster y cols. (2001) estudiaron en oocitos de *Xenopus* los efectos de coexpresar las subunidades mutadas y las WT para dos de estas mutaciones (D71V y R218Q), demostrando que las subunidades mutadas tenían un efecto dominante negativo por lo que los canales que contenían la subunidad mutada no eran funcionales (Plaster y cols., 2001). Además, muchas de las mutaciones relacionadas con el SAT1 se deben a la pérdida de función de los canales causada por alteraciones en su interacción con el PIP<sub>2</sub> (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002; Pegan y cols., 2006; Terzic y cols., 2008). Por ejemplo, las mutaciones R21Q y R21W se localizan en un grupo de residuos que están implicados en la interacción del canal con el PIP<sub>2</sub> (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002).



- Síndrome de QT corto

En el año 2005, Priori y cols. (2005) describieron la tercera variante del SQTC (SQTC3), relacionada con una mutación en el gen *KCNJ2* (Priori y cols., 2005). Esta mutación produce una ganancia de función en los canales Kir2.1, por lo que se traduce en un aumento en el flujo de salida de  $K^+$  y, consecuentemente, en una aceleración de la repolarización.

El SQTC3 se caracteriza por la aparición de ondas T asimétricas en el ECG (Priori y cols., 2005). El análisis genético de los miembros de una familia con SQTC3 ha permitido la identificación de una mutación en el gen *KCNJ2* en la que se produce la sustitución de un ácido aspártico por una asparragina en la posición 172 (D172N) de la subunidad Kir2.1 (Priori y cols., 2005). Este ácido aspártico es un aminoácido altamente conservado dentro de la familia Kir2 y, como se ha mencionado, se ha demostrado clave en la rectificación de estos canales (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a). La coexpresión del canal mutado con el WT en sistemas de expresión heterólogos demostró un aumento de la corriente generada por dichos canales. Además, mediante simulaciones por ordenador se demostró que el aumento de la corriente de salida de  $K^+$  causado por la mutación podía explicar el aumento y la asimetría de las ondas T del ECG que presentaban los pacientes (Priori y cols., 2005). Por último, aunque no se podían realizar estudios de susceptibilidad a las arritmias en estos pacientes, las simulaciones por ordenador predecían que las mutaciones causantes del SQTC3 podrían predisponer a estos pacientes a un mayor riesgo de sufrir arritmias por reentrada (Priori y cols., 2005).

- FA familiar

Estudios recientes encontraron una mutación relacionada con la FA familiar en el gen que codifica la subunidad Kir2.1 (Xia y cols., 2005). En esta mutación, la sustitución de una valina por una isoleucina en la posición 93 (V93I) produce un aumento de la corriente, aunque el mecanismo de este aumento está aún por dilucidar (Xia y cols., 2005).

- Taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas

La TVPC es una arritmia hereditaria en la que los pacientes presentan frecuentemente arritmias ventriculares y muerte súbita asociadas al ejercicio físico y a la estimulación adrenérgica (Leenhardt y cols., 1995; Tester y cols., 2006). Se han descrito varios tipos de TVPC asociados con problemas en el manejo del  $Ca^{2+}$  en los que están implicados los canales RyR (TVPC tipo 1) (Priori y cols., 2002) o la calscuestrina (TVPC tipo 2) (Postma y cols., 2002).

En un estudio reciente para la identificación de arritmias genéticamente determinadas realizado sobre una cohorte de 541 pacientes, se han identificado en el gen *KCNJ2* cuatro mutaciones relacionadas con la TVPC (R67Q, T75M, R85W y T305A) (Eckhardt y cols., 2007). El ECG de los pacientes con estas mutaciones presentaba ondas U prominentes, actividad ectópica ventricular y taquicardia ventricular polimórfica. Sin embargo, no sufrían alteraciones en los músculos esqueléticos (Eckhardt y cols., 2007). Cuando se expresaban en sistemas de expresión heterólogos, las corrientes generadas por los canales mutados presentaban <5% de la corriente generada por los canales WT y dos de estos canales (R67Q y T75M) tenían además un efecto dominante negativo cuando se coexpresaban con los canales WT. Además, la mutación T305A afectaba a las propiedades de rectificación interna del canal (Eckhardt y cols., 2007). Debido a que los pacientes portadores de estas mutaciones no presentaban los criterios del SAT, se ha sugerido que dichas mutaciones pueden ser clasificadas como causantes de TVPC.

#### 4. ARRITMIAS FIBRILATORIAS

Como se ha podido comprobar, tanto el aumento como la disminución de la  $I_{K1}$  puede ser el origen de arritmias fibrilatorias. Se define como fibrilación a la actividad eléctrica cardiaca turbulenta en la que la propagación de las ondas eléctricas se produce de forma desorganizada, dando lugar a la pérdida de función contráctil por parte del miocardio. La fibrilación puede ocurrir tanto a nivel auricular (FA), como a nivel ventricular (fibrilación ventricular o FV) y dependiendo de su localización puede tener distintas consecuencias clínicas. La FA, por ejemplo, se caracteriza por una activación rápida ( $\geq 350$  latidos/min) e irregular de las aurículas, con pérdida de eficacia mecánica por parte de las mismas y suele ir acompañada de una respuesta ventricular también irregular (Nattel, 2002). Es la causa cardiaca más frecuente de accidentes cardiovasculares y la arritmia que presenta una mayor prevalencia. Sin embargo esta prevalencia no está distribuida de forma homogénea en la población, ya que aumenta con la edad (superando el 10% en pacientes con más de 80 años) (Fuster y cols., 2006), y está asociada a diversas patologías, alcanzando hasta un 22.5% en pacientes con infarto de miocardio, un 25% en pacientes hipertensos, un 4% en pacientes con insuficiencia cardiaca leve/moderada y llegando a un 50% en pacientes con insuficiencia cardiaca grave (Maisel y Stevenson, 2003). Además, es un factor de riesgo independiente que aumenta la mortalidad de los pacientes, prácticamente duplicándola en 10 años (Stewart y cols., 2002; Miyakasa y cols., 2006; Lip y cols., 2012).

Por otra parte, la FV se caracteriza por un ECG en el que los complejos ventriculares que

cambian continuamente de frecuencia, forma y amplitud, alcanzándose frecuencias tan altas ( $\geq 500$  latidos/min) que no se produce un adecuado bombeo de sangre (Jalife, 2009). Por lo tanto, la FV es una patología potencialmente letal, siendo la causa más importante de muerte súbita cardíaca. Cada año, la FV es responsable de alrededor de 300.000 muertes al año, tan sólo en los EE.UU (Zipes y Wellens, 1998).

#### 4.1. Génesis de las arritmias fibrilatorias

El mecanismo de génesis y mantenimiento de las arritmias fibrilatorias ha sido un tema de intenso debate a lo largo de más de 100 años (Jalife, 2010). De hecho, muchos de los conceptos actuales sobre la génesis de estas arritmias se basan en ideas que durante mucho tiempo fueron desechadas.

Lo que sí está ampliamente aceptado es que estas arritmias se generan por la “reentrada” de impulso cardíaco. Para entender el concepto de reentrada hay que retroceder a los experimentos realizados por Mayer en 1906. Mayer demostró que al aplicar una combinación apropiada de pulsos a la campana contráctil de la medusa *Cassiopea xamachana* la onda inducida podía propagarse en una única dirección del anillo y continuar circulando indefinidamente (Mayer, 1906). Los experimentos fueron repetidos por Mines en anillos musculares de aurículas de peces teleósteos y en anillos musculares de ventrículos de perro (Mines, 1913 y 1914; Garrey, 1914). En base a estos experimentos Lewis propuso la hipótesis del “movimiento circular por reentrada” para explicar los mecanismos que generan la FA y el “flutter” auricular (Lewis, 1921) (Figura 33A). Según esta hipótesis, serían necesarias una serie de requisitos para que se produzca la reentrada: (i) un sustrato o tejido miocárdico con diferentes características electrofisiológicas (conducción y refractariedad); (ii) un obstáculo anatómico no excitable alrededor del cual circula en impulso (por ejemplo, una vena); (iii) un bloqueo de conducción unidireccional que obligue a la conducción en una única dirección; (iv) una región de conducción lenta que permita la recuperación del tejido refractario proximal a la localización del bloqueo unidireccional; (v) una masa crítica de tejido que pueda sostener un frente de onda circulante y (vi) un desencadenante que la inicie. Para que se produzca la reentrada incesante del estímulo en el miocardio se debe producir un equilibrio adecuado entre la excitabilidad del tejido; de la que depende la velocidad del estímulo, y la refractariedad.

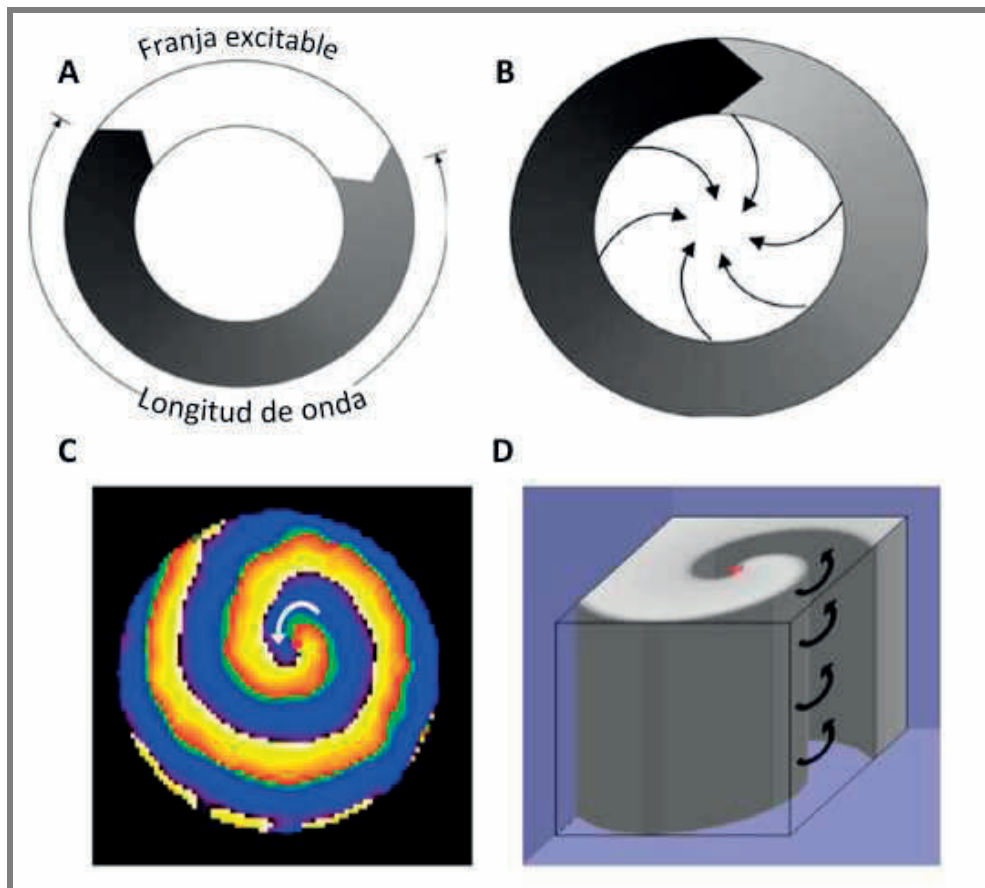
Este equilibrio fue elegantemente formulado de forma matemática por Wiener y Rosenblueth en 1945, cuando definieron la longitud de onda como el producto entre la velocidad de conducción y el periodo refractario efectivo ( $LO=VC \times PRE$ ) (Wiener y

Rosenblueth, 1945). Según este modelo, para que se produzca la reentrada, la longitud de onda debe ser más corta que la longitud del circuito, de lo contrario, el frente de onda interaccionaría con el periodo refractario de la propia onda circulante, acabando con la propagación del estímulo. Cuando la diferencia entre la LO y la LC es muy grande se habla de circuitos con “gap excitable” en los que hay una amplia franja de tejido que separa la cabeza de excitación de la cola de refractariedad. Cuando la separación es pequeña se habla de circuitos sin gap excitable. Wiener y Rosenblueth describieron también la formación de un circuito de reentrada en ausencia de un obstáculo anatómico (Wiener y Rosenblueth, 1946), pero consideraron que esta sería una situación inestable y por tanto la presencia de un obstáculo sería una condición necesaria.

A pesar de que los modelos mencionados eran capaces de explicar satisfactoriamente el mecanismo de reentrada alrededor de un obstáculo anatómico, no podían describir correctamente el mecanismo de reentrada funcional, es decir, aquella en el que el circuito esta determinado por las heterogeneidades de las propiedades electrofisiológicas del tejido involucrado (Jalife, 2010). En 1950, Gordon Moe introdujo el concepto de “reentrada por múltiples ondas”, basándose en los resultados obtenidos mediante simulaciones computerizadas. Según este mecanismo, toda la aurícula estaría participando en la FA debido a la presencia de múltiples circuitos de reentrada. Esto implica un proceso dinámico en el que los frentes de onda estarían continuamente fraccionándose y autoperpetuándose como “ondas hijas” (Moe y Abildskov, 1959; Moe y cols., 1964). Posteriormente, en los años 70, Allesie y cols., propusieron la hipótesis del “*leading circle*” o circuito guía, tras registrar, mediante microelectrodos múltiples, la formación de pequeños circuitos de reentrada ininterrumpidos en preparaciones auriculares de corazones de perros en ausencia de obstáculos anatómicos (Allesie y cols., 1973). Según estos autores, en la reentrada funcional un frente de onda lineal circula a través de tejido parcialmente refractario y alrededor de un núcleo central que se mantiene en estado refractario al ser bombardeado constantemente por los frentes de onda centrípetos (Figura 33B).

El circuito guía es por tanto el circuito más pequeño posible en el que un impulso puede continuar circulando (Allesie y cols., 1976). Aunque esta idea se basa en la hipótesis de Lewis, existen 3 diferencias significativas: (i) en teoría, la ausencia de un obstáculo anatómico imposibilita la interrupción de la arritmia mediante un estímulo externo; (ii) el circuito guía fuerza al frente de onda a invadir su propio periodo refractario, impidiendo la formación de una franja totalmente excitable, haciendo la arritmia inestable y propensa a la terminación espontánea; (iii) comparada con la reentrada anatómica, la duración del ciclo en la reentrada funcional es mucho menor (Allesie y cols., 1976 y 1977). Posteriormente, los

mismos autores demostraron que entre 4 y 6 circuitos de reentrada funcionales eran suficientes para producir una actividad turbulenta en las aurículas, apoyando la hipótesis de Moe (Allessie y cols., 1985).



**Figura 33. Cuatro conceptos diferentes de reentrada.** (A) Reentrada alrededor de un obstáculo anatómico circular. La reentrada ocurre cuando la longitud de onda (en negro) es más pequeña que el circuito permitiendo una franja excitable (en blanco). (B) Hipótesis del circuito guía. El frente solapa con la cola gracias a una franja excitable parcial. La hipótesis sugiere que los frentes de onda que invaden el centro provocan un estado refractario. (C) Onda espiral bidimensional rotando en sentido anti-horario alrededor de un núcleo no excitado pero excitable (punto rojo) en una monocapa de miocitos ventriculares de ratas neonatales. (D) Simulación por ordenador de un rotor en tres dimensiones rotando en sentido anti-horario. [Adaptada de Jalife, 2009]

Sin embargo, aunque esta hipótesis prevaleció durante 20 años, era insuficiente para explicar la dinámica de la FA y la FV (Davidenko y cols., 1990, Jalife y cols., 1998). El principal problema es que el circuito guía implica, por definición, un estado refractario del centro de rotación. Por lo tanto, fija la onda circulante en un punto estable e impide que el centro de rotación migre (Allessie y cols., 1977). Pero, como diversos estudios han comprobado, el desplazamiento y la migración de las ondas circulantes son características muy importantes de la reentrada funcional, particularmente cuando el sustrato es heterogéneo (Jalife y Gray, 1996; Jalife y Pandit, 2005; Mansour y cols., 2001).

En paralelo con las investigaciones mencionadas se fue desarrollando el concepto de la formación de ondas espirales debido a la presencia de “rotores” en el tejido cardiaco (Krinsky, 1966; Winfree, 1987). El músculo cardiaco, como medio excitable que es, comparte muchas características con otros medios excitables como las reacciones químicas autocatalíticas, las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cardiacas, el cerebro, la retina, etc. (Winfree, 1972 y 1989; Gray y cols., 1998). Una de las propiedades de estos medios es la formación de ondas en forma de vórtices alrededor de una “singularidad de fase” (como los observados en los torbellinos o los huracanes). Estas singularidades de fase o pivotes se crean tras la rotura de un frente de onda al encontrarse en su propagación con tejido refractario o con un obstáculo anatómico. En ese punto de ruptura, el frente de onda se curva y enlentece hasta llegar a converger con su propia cola de refractariedad, creándose un rotor (Figura 33C). Cuando un rotor está estacionario, pivota alrededor de la singularidad de fase en una trayectoria circular que forma el núcleo de la onda espiral. Sin embargo, cuando el rotor migra, su trayectoria puede tener distintas formas, dependiendo de la excitabilidad del tejido. Se propuso que estos rotores podrían existir en el corazón y que serían el verdadero mecanismo de reentrada funcional. El equivalente de una onda espiral en 3 dimensiones se denomina “scroll wave” (Figura 33D) (Winfree, 1973). La primera demostración experimental de una onda espiral en el corazón fue hecha en cortes ventriculares de corazones de oveja por Davidenko y cols., en 1990 (Davidenko y cols., 1990). Esto fue posible gracias al uso de colorantes potenciométricos que permitieron el mapeo de alta resolución de la actividad eléctrica cardiaca (Salama y Morad, 1976). En las siguientes dos décadas se ha ampliado el conocimiento sobre la dinámica, formación, mantenimiento y fragmentación de las ondas espirales y de los rotores (Jalife y cols., 1998; Taberaux y cols., 2009; Jalife, 2011; Pandit y Jalife, 2013). Aunque aún existe un debate sobre los mecanismos precisos de la fibrilación (esto es, si se debe a un pequeño número de rotores o a múltiples ondas), la teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de las arritmias fibrilatorias (Voigt y cols., 2010; Skanes, 2009; Jalife, 2011; Narayan y cols., 2012; Pandit y Jalife, 2013).

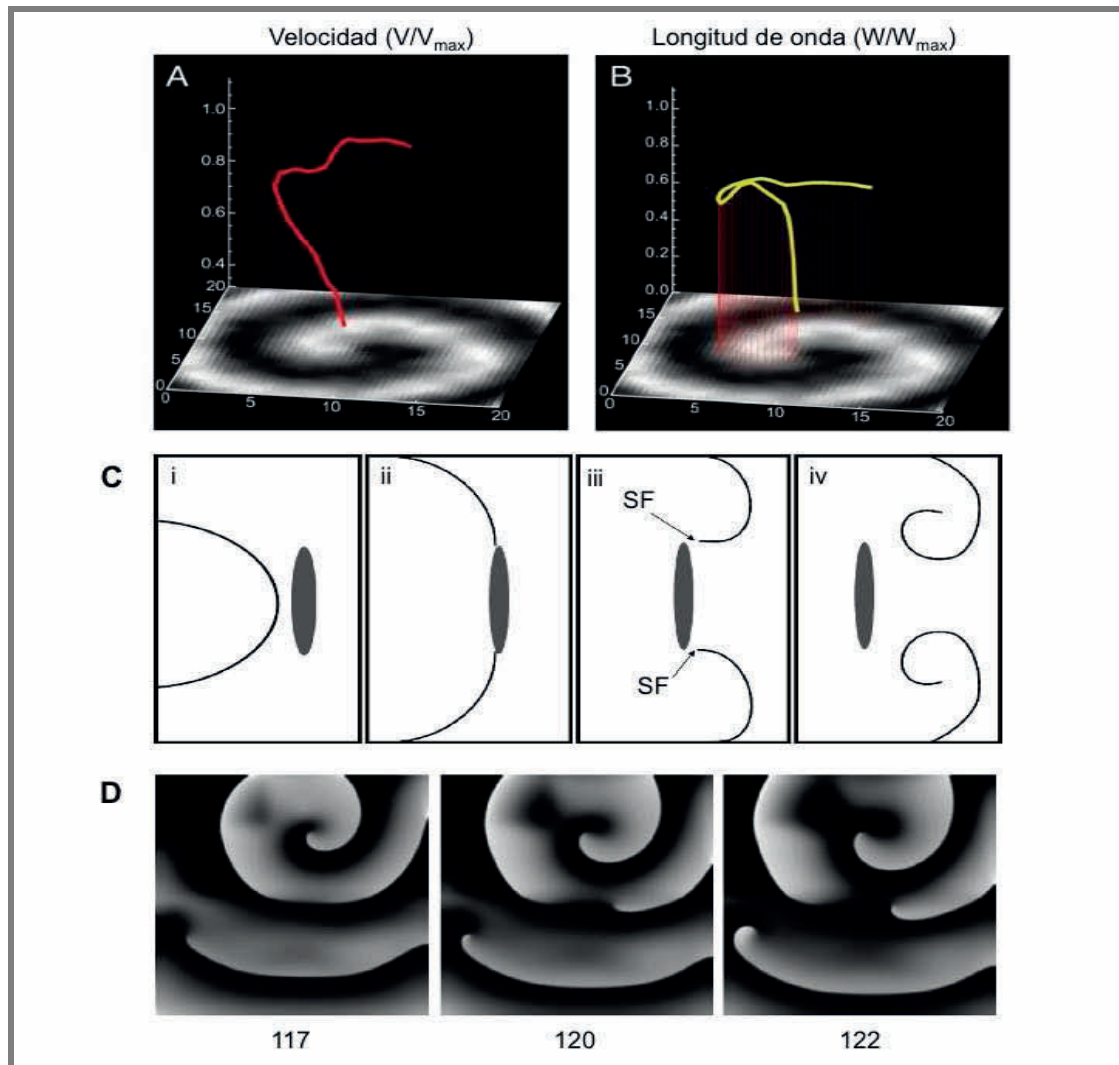
#### **4.2. Dinámica de los rotores**

La excitabilidad y refractariedad del medio determinan la dinámica de los rotores (Zykov, 1980). La excitabilidad condiciona la velocidad de conducción del frente en su propagación alrededor del núcleo y, con ella, la frecuencia de rotación. Asimismo, determina el radio del núcleo al condicionar el valor crítico de curvatura del vértice de la espiral e impedir la propagación hacia su interior. Está bien establecido que los frentes de onda cóncavos se

propagan más rápidos que los frentes de onda planos y estos a su vez, se propagan más rápido que los frentes de onda convexos (Fast y Kléber, 1997). Los frentes de ondas de un rotor tiene una curvatura convexa creciente hacia el núcleo, lo que provoca una disminución de la velocidad de conducción hacia el centro de rotación (Figura 34A). En el perímetro del núcleo la curvatura alcanza un valor crítico que provoca una desproporción entre la corriente despolarizante que genera el frente de onda (la  $I_{Na}$ , principalmente) y la corriente electrotónica necesaria para despolarizar las células en estado de reposo del núcleo (controlada por la  $I_{K1}$ ).

Por otra parte, la refractariedad total en el vértice de la reentrada está definida por la suma de la DPA de las células recién despolarizadas, o refractariedad absoluta, más la franja de baja excitabilidad que la secundaria, o refractariedad relativa. Ambas establecen el estado del tejido que precede al frente de onda reentrante en las inmediaciones del núcleo. Así, la refractariedad también modula la excitabilidad del tejido en el vértice de la espiral, condicionando la frecuencia y el tamaño del núcleo del rotor (Zykov, 1980; Pertsov y cols., 1981).

Cabe estacar las importantes diferencias entre la dinámica de los rotores y la de los circuitos guía. Primero, el circuito guía considera el frente de onda lineal, por lo que la velocidad de conducción es la misma en cualquier punto del frente (Fast y Kléber, 1997). Sin embargo, en un frente espiral, la velocidad de conducción depende de la curvatura y por lo tanto disminuye progresivamente hacia el centro del rotor. La segunda diferencia es que la hipótesis el circuito guía asume que en el núcleo existe una refractariedad total, debido a la invasión continua de las ondas centrípetas, impidiendo al circuito de reentrada migrar a través del tejido cardiaco (Figura 33B). Por el contrario, los rotores son capaces de desplazarse y migrar dado que pivotan alrededor de tejido no excitado pero excitable (Gray y cols., 1995). Por lo tanto, el mecanismo de rotación no depende de la refractariedad del núcleo, sino de cuán acusada sea la curvatura cerca del punto de singularidad, que es el factor que enlentece la conducción hasta el punto crítico en el que el frente de onda es incapaz de invadir el núcleo (Jalife, 2009). Por último, en la teoría de rotores, la longitud de onda tampoco es fija, sino que se acorta progresivamente conforme uno se acerca al punto de singularidad (Figura 34B), debido a los gradientes electrotónicos que se establecen entre las células del núcleo y las células vecinas (Jalife, 2009). Esto tendrá importantes implicaciones a la hora de modular el PA mediante fármacos dado que no existe una DPA única en los rotores, sino multitud de valores distintos dependiendo de su posición en el frente espiral (Jalife, 2009 y 2010; Pandit y Jalife, 2013).



**Figura 34. Dinámica, formación y fragmentación de los rotores.** (A y B) Representación tridimensional de la velocidad de conducción (A) y de la longitud de onda (B) en un rotor obtenida por mapeo óptico de una monocapa de miocitos ventriculares neonatales de rata. La velocidad de conducción disminuye al aumentar la curvatura del rotor. La longitud de onda sigue los cambios de la velocidad de conducción y la DPA. (C) Formación de un rotor. Una onda alcanza un obstáculo funcional (i) y empieza a circunvalarlo (ii). Si las condiciones de excitabilidad son las adecuadas, 2 ondas hijas se separan del obstáculo, generando una singularidad de fase (SF) en cada extremo del rotor (iii). Las ondas formadas se curvan alrededor de las singularidades y empiezan a rotar (iv). (D) Modelo por ordenador de un rotor a altas frecuencias en una capa de miocitos ventriculares. Se aprecia como las ondas que emanan del rotor se fragmentan, iniciando una conducción fibrilatoria. Los números bajo cada fotograma indican milisegundos [Adaptada de Vaquero y cols., 2008 y Jalife, 2009]

### 4.3. Formación de los rotores

Las ondas de reentrada pueden iniciarse como consecuencia de la interacción de un frente de onda con un obstáculo apropiado que se interpone en su camino (Pertsov y cols., 1993). Dependiendo de la excitabilidad del tejido, esto puede dar lugar a una reentrada funcional. Por ejemplo, si la excitabilidad del tejido es alta, el frente de onda circunvala al obstáculo, sin separarse de él, sus dos extremos se reencuentran, se fusionan, recuperan su forma primitiva y continúan su camino. Si la excitabilidad es menor (o con frecuencia de excitación más alta),



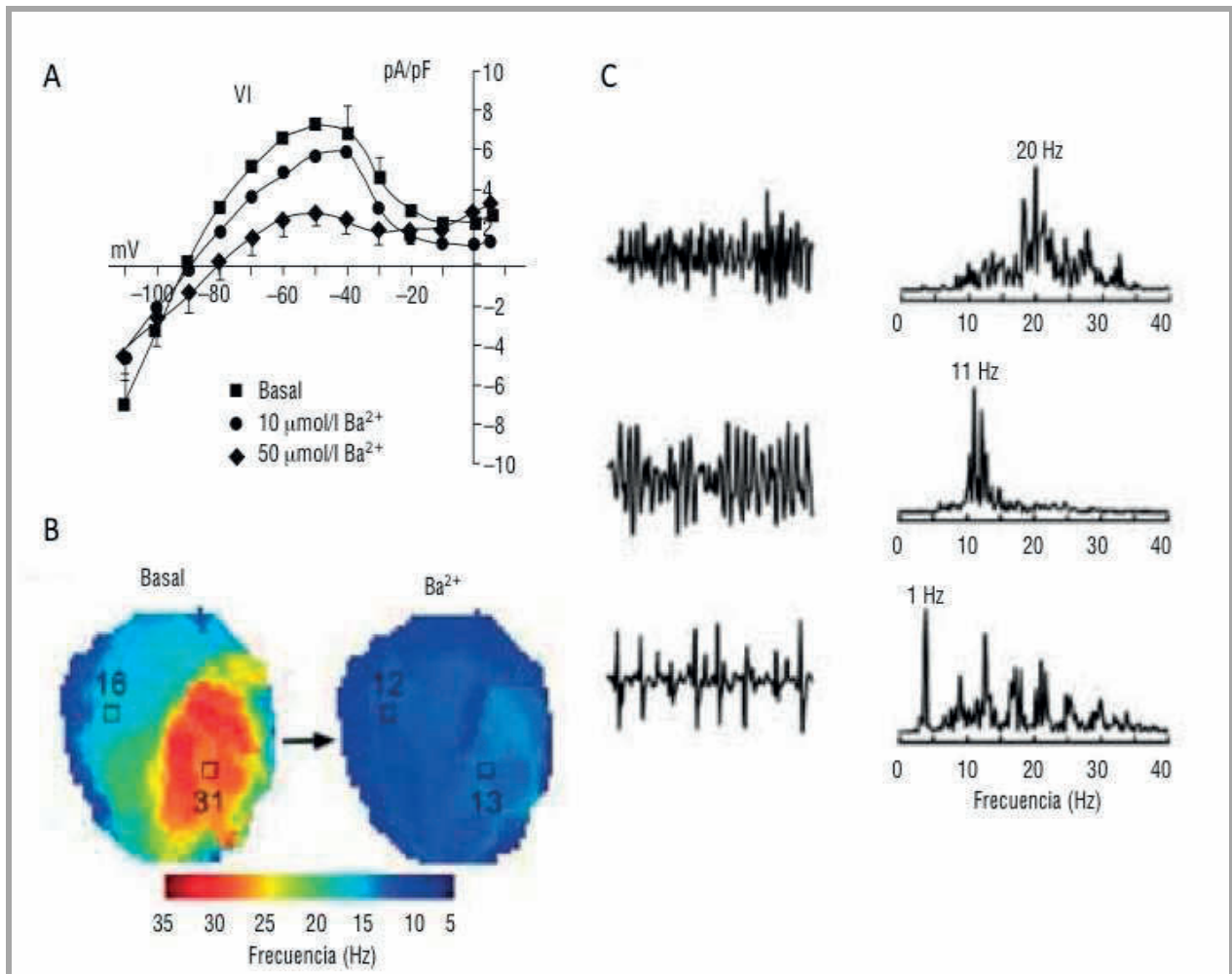
los extremos rotos no convergen, sino que se separan del obstáculo, moviéndose en direcciones opuestas, de forma que el frente de onda se fragmenta en dos ondas hijas, cada una flanqueada por una singularidad de fase y un borde del tejido. Cada frente de onda se curva sobre su pivote e inicia un movimiento de reentrada funcional en figura de ocho (Figura 34C). Cuando la excitabilidad es aún más baja, el frente de onda también se rompe en dos, pero las ondas hijas resultantes se encogen gradualmente hasta desaparecer; es decir, sufren “conducción decremental”. De acuerdo con la teoría de los sistemas excitables, para que el frente de onda se divida en dos, el tamaño del obstáculo ha de ser similar al de la anchura del frente de onda (Pertsov y cols., 1990). Como la anchura del frente de onda en el músculo cardíaco normal es de 1 mm aproximadamente (Spach y cols., 1989a y 1989b), sólo los obstáculos  $\geq 1$  mm pueden fragmentar los frentes de onda (Figura 34D).

Este fenómeno se denomina *vortex shedding* (literalmente, “vertiente de vórtices”) (Cabo y cols., 1996) y requiere que se cumplan 2 condiciones: a) que tanto la estructura anatómica como las propiedades electrofisiológicas del músculo cardíaco sean heterogéneas (Zipes y Wellens, 1998), y b) que en algún lugar del corazón se favorezca la formación de un foco ectópico cuya frecuencia de activación sea tan alta que los frentes de onda que genere choquen con las colas refractarias de ondas previas.

La complicada estructura anatómica del corazón normal y la variabilidad intrínseca de las propiedades electrofisiológicas genera gradientes espaciales de períodos refractarios lo que constituye una fuente de obstáculos que puede llevar al establecimiento de arritmias de reentrada (Laurita y cols., 1996). No obstante, habitualmente no hay arritmias sostenidas ya que sólo pueden inducirse mediante estímulos de alta frecuencia o muy prematuros, y/o en presencia de isquemia, fármacos o anomalías genéticas. De hecho, este tipo de arritmias son más frecuentes en pacientes que presentan arterioesclerosis coronaria, alteraciones fibróticas miocárdicas difusas o ambas. Hoy día existe un acuerdo general en que la heterogeneidad eléctrica que lleva al establecimiento de gradientes refractarios es el factor más importante causante de la iniciación de la FV (Zipes y Wellens, 1996).

#### 4.4. Papel de la $I_{K1}$ en el mantenimiento de los rotors

La  $I_{K1}$  juega un papel fundamental en la fase final de la repolarización del PA (es decir, la fase 3). De hecho, el aumento en la densidad de la  $I_{K1}$  acorta la DPA, mientras que su disminución tiene el efecto contrario (Lopatin y Nichols, 2001).



**Figura 35. Bloqueo de la  $I_{K1}$  y dinámica de la FV.** (A) Rectificación de  $I_{K1}$  en los miocitos del ventrículo izquierdo de cobaya tras perfusión con 2 dosis de  $\text{Ba}^{2+}$ . (B) Mapas promedio de las frecuencias dominantes que muestran cómo la heterogénea distribución en el control se homogeniza tras el  $\text{Ba}^{2+}$  después de la importante disminución de la frecuencia del rotor principal situado en ventrículo izquierdo. (C) Electrocardiograma y sus transformadas de Fourier en situación de control y tras el  $\text{Ba}^{2+}$ , antes y después de la conversión de la FV en una arritmia polimórfica más lenta. [Adaptada de Warren cols., 2003]

El papel de la  $I_{K1}$  en el comportamiento de los rotores ha sido investigado tanto con simulaciones por ordenador como experimentalmente. Mediante cartografía óptica en corazones de cobayo se observó que la FV presenta frecuencias dominantes significativamente mayores en ventrículo izquierdo (32 Hz) que en el derecho (14 Hz) (Samie y cols., 2001).

Al registrar la  $I_{K1}$  en miocitos de ambas cámaras se observó que la rectificación de la  $I_{K1}$  es menor en las células del ventrículo izquierdo que en las del derecho. Esta diferencia en la intensidad de la rectificación de  $I_{K1}$ , fue posteriormente atribuida a una mayor presencia de canales Kir2.1 en el ventrículo izquierdo (Warren y cols., 2003). La menor rectificación implica una mayor cantidad de corriente repolarizante durante la fase 3 del PA y, por tanto, una menor duración de los PAs en el ventrículo izquierdo que en el derecho. La menor DPA permite la estabilización del rotor en el ventrículo izquierdo. Esto desestabiliza el rotor,

evitando así que el ventrículo derecho sea capaz de mantener espirales estables a tan altas frecuencias (Samie y cols., 2001).

Para confirmar la hipótesis del papel de la amplitud del componente de salida de la  $I_{K1}$  en la estabilización de los rotores en el ventrículo izquierdo, Warren y cols. (2003) utilizaron diversas concentraciones de  $Ba^{2+}$  (1-50  $\mu M$ ) (Kubo y cols., 1993a) para inhibir de manera selectiva la  $I_{K1}$  (Figura 35A) (Warren y cols., 2003). Demostraron que la inhibición de la  $I_{K1}$  disminuye las frecuencias de excitación del ventrículo izquierdo (Figura 35B) y aumentan la organización de la FV (Figura 35C) transformándola en taquicardia ventricular con una frecuencia mucho menor (Dorian y cols., 1996; Warren y cols., 2003).

La sobreexpresión de  $I_{K1}$  en corazones de un modelo transgénico de ratón acelera la fase final de la repolarización del PA, acortando la DPA y el intervalo QT (Li y cols., 2004; Noujaim y cols., 2007). Durante la reentrada, esto provoca una longitud de onda menor y una hiperpolarización de la membrana, lo que contribuye a una mayor disponibilidad de canales de  $Na^+$  durante el periodo excitable, y por tanto un aumento de la excitabilidad. Además, la sobreexpresión de  $I_{K1}$  aumenta el gradiente de voltaje entre las células en reposo del centro del rotor y las células activas adyacentes. Estos efectos ayudan a potenciar las corrientes electrotonicas que fluyen continuamente entre las células en reposo y las células activas, lo que contribuye a acelerar la repolarización de las células activas (Beaumont y cols., 1998; Noujaim y cols., 2007). El resultado final es un rotor más rápido y estable en los corazones transgénicos que en los corazones de ratones WT. Además, durante la reentrada, en los corazones transgénicos que sobreexpresan  $I_{K1}$ , las células no excitadas en el centro del rotor, tienen una conductancia de salida mayor, lo que disminuye la probabilidad de ser excitadas por la influencia despolarizadora de las células adyacentes, ayudando a reducir el tamaño del centro del rotor y su desplazamiento, y por tanto estabilizándolo. En el modelo matemático de FA diseñado por Courtemanche, la sobreexpresión de  $I_{K1}$ , también aceleraba y estabilizaba la actividad del rotor, en consonancia con lo descrito anteriormente (Pandit y cols., 2005). En el mismo modelo se estudiaron los efectos de la reducción de la conductancia y del grado de rectificación de la  $I_{K1}$ . La reducción en un 20% de la conductancia de  $I_{K1}$  enlenteció pero no terminó con la actividad del rotor. Sin embargo, la modificación de los perfiles de rectificación de la  $I_{K1}$ , tanto reduciendo el pico máximo de la corriente de salida, como aumentando el grado de rectificación provocaba el enlentecimiento e incluso terminación del rotor (Pandit y cols., 2005).

Por tanto, todos estos experimentos apoyan el hecho que la  $I_{K1}$  es un estabilizador de la reentrada, dada su capacidad de acortar la DPA y reducir la velocidad de conducción cerca del centro del rotor (Beaumont y cols., 1998; Samie y cols., 2001; Noujaim y cols., 2007; Grzeda

y cols., 2009). Un aumento en la  $I_{K1}$ , previene las interacciones entre el frente de onda y la cola de refractariedad, y por tanto evita la desestabilización del rotor y su fraccionamiento (Samie y cols., 2001). Además, la relación entre la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$ , es un factor muy importante en el control de la excitabilidad cardiaca, y por consiguiente de la estabilidad y frecuencia de la reentrada (Noujaim y cols., 2007). Por lo tanto, esto convierte a la  $I_{K1}$  en una diana para el desarrollo de los nuevos fármacos antiarrítmicos para el tratamiento de las arritmias fibrilatorias. Dado que la FA es la arritmia más frecuente afectando a más del 1% de la población general, lo óptimo sería el desarrollo de un fármaco que disminuyera la  $I_{K1}$  auricular sin modificar las corrientes ventriculares. Para ello el primer requisito es que la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  auricular y ventricular fueran diferentes.

## 5. FÁRMACOS ANTIARRÍTMICOS

Los fármacos antiarrítmicos (FAA) son un grupo muy heterogéneo de sustancias que suprimen y/o previenen las alteraciones del ritmo cardíaco. El tratamiento antiarrítmico tiene dos objetivos: a) aliviar los síntomas del paciente (palpitaciones, fatiga, síncope) o sus complicaciones (tromboembolismos, insuficiencia cardiaca), lo que se puede conseguir, tanto por suprimir o reducir la frecuencia de la arritmia, como por prevenir su recurrencia; y b) prolongar la supervivencia y reducir el riesgo de muerte súbita. Sin embargo, los ensayos clínicos controlados han demostrado que los fármacos antiarrítmicos no sólo son poco efectivos para controlar las arritmias cardiacas, sino que pueden producir importantes reacciones adversas, cardiacas y extracardiacas y, paradójicamente, pueden inducir y/o perpetuar las arritmias del paciente (*efectos proarrítmicos* de los FAA). Si a todo lo anterior añadimos que en la mayoría de los casos desconocemos los mecanismos implicados en la génesis y/o mantenimiento de la arritmia, es evidente que el tratamiento antiarrítmico es en muchos casos empírico, basándose la selección del fármaco antiarrítmico en las características de la arritmia, la comorbilidad del paciente y, sobre todo, en el perfil de seguridad del fármaco seleccionado.

A pesar de todo lo anterior, los fármacos antiarrítmicos continúan siendo el tratamiento de elección en la mayoría de los pacientes con arritmias, aunque las estrategias no-farmacológicas (desfibriladores implantables, marcapasos, ablación con catéter) y quirúrgicas de las arritmias pueden ser el tratamiento de elección en determinados grupos de pacientes. Es más, incluso los pacientes sometidos a ablación y los portadores de un desfibrilador implantable requieren, con frecuencia, la administración de fármaco antiarrítmico para controlar las arritmias sintomáticas (Tamargo y Valenzuela, 2008).

## 5.1. Clasificación

La clasificación de FAAs en cuatro grupos propuesta por Vaughan-Williams es la que más frecuentemente se utiliza a pesar de sus limitaciones (Vaughan-Williams, 1970):

- **Grupo I:** Bloqueantes de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje.
- **Grupo II:** Antagonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
- **Grupo III:** Fármacos que prolongan la DPA y el periodo refractario cardíaco a concentraciones a las que no modifican la velocidad de conducción intracardiaca.
- **Grupo IV:** Fármacos bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje tipo L.

Sin embargo, esta clasificación no incluye diversos fármacos antiarrítmicos y asume que el mecanismo de acción de los fármacos pertenecientes a un mismo grupo está únicamente relacionado con el descrito en la clasificación; no obstante, la mayoría de los fármacos antiarrítmicos presentan más de un mecanismo de acción antiarrítmico. Esto explica por qué, en contra de lo que se podría esperar, fármacos de un mismo grupo pueden presentar propiedades y aplicaciones clínicas muy dispares (Tamargo y Valenzuela, 2008).

## 5.2. Farmacología de los FAA del grupo I

Estos fármacos bloquean los canales de  $\text{Na}^+$  lo que disminuye la entrada de  $\text{Na}^+$  durante la fase 0 y, con ello, la amplitud de los PAs generados. Como consecuencia, la diferencia de potencial entre la célula excitada y las adyacentes es menor, y el circuito local de corriente que permite la excitación de las células contiguas puede no ser suficiente para conseguir la progresión del frente de activación. Los FAAs del grupo I deprimen la excitabilidad y la velocidad de conducción del impulso en el circuito de reentrada siendo este efecto más marcado en las áreas donde la conducción estaba más deprimida. Como se ha mencionado antes, la depresión de la excitabilidad disminuye la frecuencia de rotación de los rotores porque amplía su radio de giro, obligándolos a invadir un área miocárdica mayor y disminuyendo la probabilidad de su mantenimiento. Sin embargo, la disminución de la excitabilidad también puede hacer que un frente de activación se fragmente y si esta

disminución no es homogénea, hará que el frente gire en torno a las zonas en las que la depresión es mayor y se genere un nuevo circuito reentrante (Delpón y cols., 2008b).

### 5.2.1. Mecanismo general de acción

Los FAA del grupo I se unen en un sitio receptor localizado en la región del poro de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $\text{Na}^+$  cardiaco. Para acceder a este receptor atraviesan por difusión pasiva la membrana celular y penetran en el poro desde la cara citoplasmática. Todos los FAA del grupo I son bases débiles que a pH fisiológico coexisten en forma catiónica y neutra, predominando la catiónica. Es la forma neutra (F) la que puede atravesar la membrana, pero es la catiónica ( $\text{FH}^+$ ) la que se une al receptor. El sitio receptor para FAA del grupo I está localizado en el S6 del dominio IV (IVS6) siendo críticos para la unión los residuos Y1771 y F1764, aunque están involucrados otros residuos localizados en el S6 del dominio III. La conformación del receptor probablemente cambia en cada uno de los 3 estados en los que puede estar el canal de  $\text{Na}^+$  (es decir, abierto, inactivo y cerrado), lo que explicaría por qué la afinidad de los FAA por el receptor no es constante, sino que está modulada por el estado en el cual se encuentra el canal (hipótesis del receptor modulado). La afinidad de los FAA del grupo I por el canal en estado cerrado es muy baja, pero es alta en estado abierto y/o inactivo. Todos los FAA del grupo I prolongan el tiempo necesario para la reactivación del canal de  $\text{Na}^+$  desde  $\approx 20$  ms hasta incluso varios segundos. Esta prolongación del tiempo de reactivación es responsable del bloqueo de la conducción durante una taquicardia rápida, cuando el intervalo diastólico se abrevia tanto que no permite que se complete la reactivación (Delpón y cols., 2008b).

Los FAA del grupo I presentan importantes diferencias farmacológicas entre sí que no se limitan al tipo de bloqueo del canal de  $\text{Na}^+$  que producen. Prácticamente todos ellos bloquean en mayor o menor medida alguno/s de los canales de  $\text{K}^+$  y/o de  $\text{Ca}^{2+}$ . Muchos de ellos son también antagonistas de receptores adrenérgicos y/o muscarínicos. Son fármacos por tanto con multiplicidad de acciones que modulan los efectos electrofisiológicos finales que se observan en la clínica. Utilizando como criterio cuánto prolongan la reactivación del canal de  $\text{Na}^+$  se han subclasificado en tres subgrupos:

- **Subgrupo Ia:** retrasan la reactivación del canal de  $\text{Na}^+$  llegando a ser necesarios  $\approx 5$  s para que ésta se complete. Todos ellos bloquean diversos canales de  $\text{K}^+$ , pero es el bloqueo de la corriente  $I_{Kr}$  el principal responsable de la prolongación de la DPA y del

intervalo QT que producen. Como consecuencia de la prolongación de la DPA y de la reactivación, prolongan el periodo refractario. Presentan una potencia de bloqueo del canal de  $\text{Na}^+$  entre moderada y marcada, deprimiendo la velocidad de conducción intracardíaca y prolongando el intervalo QRS cuando el paciente está en ritmo sinusal.

- **Subgrupo Ib:** son los que menos retrasan la reactivación del canal de  $\text{Na}^+$  (200-500 ms), y no bloquean canales de  $\text{K}^+$ , por lo que acortan la DPA por disminuir la entrada de  $\text{Na}^+$  durante la fase 2. Por tanto sus efectos sobre el complejo QRS y el QT son mínimos. Son muy eficaces para prevenir extrasístoles precoces o taquicardias con una frecuencia rápida y sus efectos se potencian en células parcialmente despolarizadas (isquemia, intoxicación digitalica). Sin embargo, no bloquean la conducción intracardíaca cuando el paciente está en ritmo sinusal, puesto que el intervalo diastólico es lo suficientemente prolongado ( $\approx 800$  ms) como para permitir la reactivación del canal.
- **Subgrupo Ic:** son los que más retrasan la reactivación del canal llegando hasta  $\approx 12$  s. Por ello deprimen la velocidad de conducción intracardíaca y prolongan el intervalo QRS cuando el paciente está en ritmo sinusal. Prolongan la repolarización en el tejido auricular de modo dependiente de la frecuencia pero apenas si modifican la ventricular.

Dado que el tiempo que tardan los fármacos de los grupos Ia y Ic en disociarse del canal es mucho mayor que el intervalo entre dos latidos cardiacos normales, estos fármacos deprimen la velocidad de conducción intraauricular e intraventricular (prolongan el QRS) incluso en pacientes en ritmo sinusal. Esta depresión facilitaría la aparición de bloqueos intracardiacos y arritmias por reentrada, particularmente en pacientes con cardiopatías estructurales (cardiopatía isquémica, hipertrofia o insuficiencia cardiaca) (Delpón y cols., 2008b).

### 5.2.2. FAA del grupo Ic

**Flecainida** y **propafenona** (Figura 36) presentan una elevada afinidad por el estado activo del canal de  $\text{Na}^+$  y prolongan de forma marcada su reactivación, siendo los fármacos que más deprimen la  $I_{\text{Na}}$  y los que mayor incidencia de efectos arritmogénicos producen.

### 5.2.2.a. Acciones farmacológicas

A concentraciones terapéuticas, son los fármacos antiarrítmicos que más deprimen la velocidad de conducción intraauricular e intraventricular (ensanchan el QRS). Ello explica por qué pueden facilitar la aparición de bloqueos intracardiacos y arritmias por reentrada, particularmente en pacientes con alteraciones previas de la conducción ventricular (p.ej. postinfarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, miocardiopatías). Aunque no modifican la DPA ventricular (no prolongan el QT), sí prolongan el periodo refractario ventricular al retrasar de forma marcada la reactivación del canal de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, flecainida y propafenona prolongan la DPA y de los periodos refractarios auriculares, siendo este efecto más marcado a frecuencias auriculares rápidas, lo que explica su efectividad para convertir la fibrilación auricular a ritmo sinusal. También deprimen la velocidad de conducción y prolongan el periodo refractario del nódulo AV y de las vías accesorias AV. Flecainida y propafenona modifican poco la frecuencia sinusal, pero suprimen el automatismo del sistema de His-Purkinje, el automatismo anormal y la actividad desencadenada por pospotenciales tempranos o tardíos (Tamargo y Valenzuela, 2008).

La flecainida o la propafenona apenas si modifican la contractilidad cardiaca, la presión arterial o el volumen minuto cardiaco, pero cuando se administran por vía intravenosa o en pacientes con insuficiencia cardiaca reducen la contractilidad, pudiendo desencadenar o agravar la insuficiencia cardiaca.

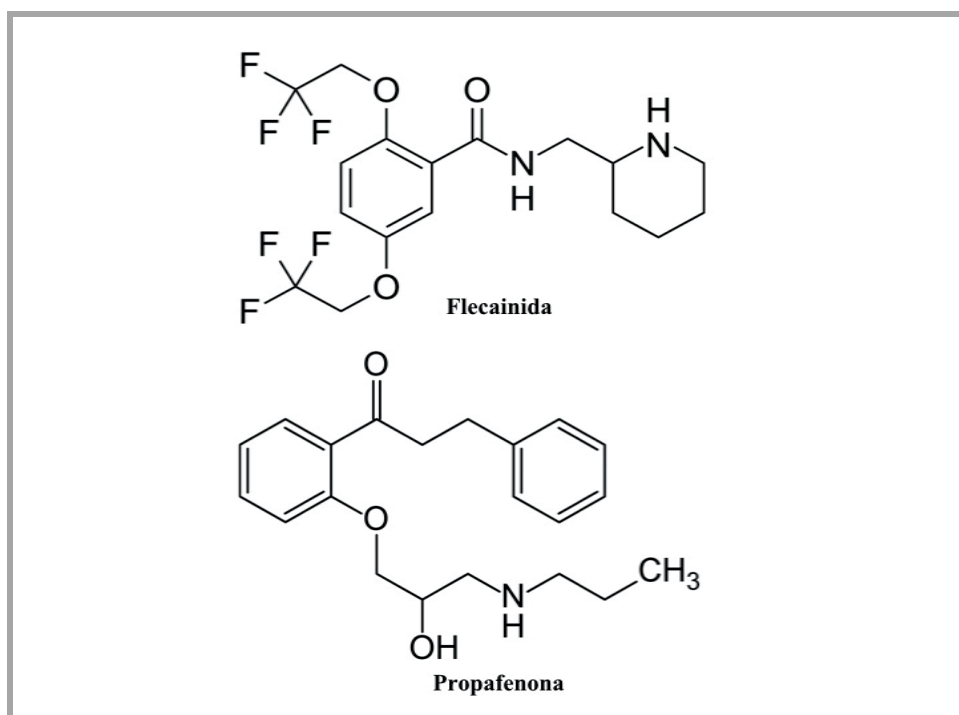
### 5.2.2.b. Características farmacocinéticas

La flecainida se absorbe muy bien por vía oral (biodisponibilidad 95%) y alcanza su  $C_{\text{max}}$  al cabo de 1-2 h. Se une a proteínas plasmáticas en un 40% y se biotransforma en un 75% en el hígado, formándose metabolitos conjugados inactivos que se eliminan junto con el fármaco no biotransformado por vía renal. Su semivida es de unas 8-14 h y aumenta (19-50 h) en pacientes con insuficiencia cardiaca, arritmias ventriculares o insuficiencia renal.

La propafenona se absorbe bien por vía oral, pero su biodisponibilidad es baja (5-30%) ya que sufre un importante efecto de primer paso hepático. Su acción aparece al cabo de 30 min, alcanza su  $C_{\text{max}}$  al cabo de 2-4 h y se prolonga durante 8 h. Por vía intravenosa, su efecto es inmediato y se prolonga durante 2 h. Se une a la  $\alpha_1$ -glucoproteína ácida (95%), se distribuye ampliamente y se biotransforma por el CYP2D6 en diversos metabolitos, de los que la 5-hidroxi-propafenona es más potente que la propia propafenona para inhibir la  $I_{\text{Na}}$ . En los metabolizadores rápidos (90% de la población) su semivida es de 5-8 h y en los lentos de 15-



17 h. La propafenona y sus metabolitos se eliminan conjugados por vía renal (Tamargo y Valenzuela, 2008).



**Figura 36. Estructuras químicas de la flecainida y la propafenona.**

#### 5.2.2.c. Aplicaciones terapéuticas

Los fármacos del grupo Ic son de elección para revertir la fibrilación auricular a ritmo sinusal en las primeras 48 horas de su aparición y para prevenir las recurrencias en pacientes sin cardiopatía estructural. Recientemente, se ha acuñado el término “píldora en el bolsillo”, que consiste en que el paciente se auto-administre un fármaco del grupo Ic tan pronto como aparecen los síntomas de fibrilación auricular con el fin de revertir la arritmia lo más rápidamente posible a ritmo sinusal. Sin embargo, antes es necesario probar en medio hospitalario que el paciente tolera estos fármacos y descartar la existencia de disfunción de los nódulos SA o AV, bloqueo de rama, cardiopatía estructural o un síndrome de Brugada. También son efectivos en la profilaxis y tratamiento de taquicardias por reentrada intranodal, y, por deprimir la conducción anterógrada y retrógrada a través del nódulo AV y de las vías accesorias, en taquiarrimias asociadas al síndrome de Wolff-Parkinson-White.

Sin embargo, la flecainida y la propafenona están contraindicados en el tratamiento de extrasístoles ventriculares y taquicardias ventriculares en pacientes con cardiopatía estructural (infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca) ya que aumentan 2-3 veces la mortalidad total y

arritmogénica. Ello es debido a que deprimirían aún más la excitabilidad y la velocidad de conducción, facilitando la aparición de nuevas áreas de bloqueo y de taquiarritmias ventriculares por reentrada. Es decir, que la flecainida podría los convertir episodios isquémicos no fatales en fatales. Por tanto, sólo se utilizarán en pacientes con taquicardias ventriculares sin cardiopatía estructural o en taquicardias ventriculares recurrentes en pacientes portadores desfibrilador automático (Tamargo y Valenzuela, 2008).

#### 5.2.2.d. Reacciones adversas e interacciones

Las más frecuentes son digestivas (estreñimiento, náuseas, vómitos, anorexia, molestias abdominales, disgesia, ictericia colestásica) y neurológicas (mareos, fatiga, parestesias, cefaleas, alteraciones del gusto, visión borrosa, diplopía), pero las más graves son las cardiovasculares (depresión de la contractilidad, hipotensión, bradicardia, bloqueos AV e intraventriculares y taquiarritmias ventriculares) (Tamargo y Valenzuela, 2008).

Una de las reacciones adversas más peligrosas es el agravamiento de la arritmia original o la inducción de nuevas arritmias que pueden ser incluso mortales (Echt y cols., 1991). Se han descrito dos tipos de efectos proarrítmicos; uno relacionado con el bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  y otro con la prolongación excesiva de la DPA, debido al bloqueo de canales de  $\text{K}^+$  cardíacos. La depresión de la excitabilidad constituye, simultáneamente, el origen de los efectos anti y proarrítmicos, y por lo tanto, cuanto más deprimen la excitabilidad y más potentes efectos antiarrítmicos producen, más riesgo conllevan. Sus acciones proarrítmicas son más frecuentes en pacientes con insuficiencia cardíaca, trastornos previos de la conducción intraventricular, cardiopatía isquémica o cardiopatías estructurales (Delpón y cols., 2008b). En un 1-2% de los pacientes flecainida y propafenona pueden convertir la fibrilación auricular en un “flutter” con conducción AV 1:1, aumentando la frecuencia ventricular hasta 160-180 latidos/min; para evitarlo, es necesario administrar previamente un fármaco que deprima la conducción AV (digoxina,  $\beta$ -bloqueantes, verapamilo o diltiazem) (Tamargo y Valenzuela, 2008). Las principales interacciones farmacológicas se muestran en la Tabla 16.

La flecainida y la propafenona están contraindicadas en pacientes con hipotensión arterial, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, enfermedad del seno, bradicardia o bloqueos AV o intraventriculares (a menos que se haya implantado un marcapaso). La propafenona, por su acción  $\beta$ -bloqueante, podría estar contraindicada en metabolizadores lentos asmáticos (Tamargo y Valenzuela, 2008).

Fármaco	Interacción con	Resultado
Flecainida	Amiodarona	Aumentan las Cp de flecainida
	Digoxina	Mayor riesgo de bradicardia y bloqueo AV
	FAA del grupo Ia	Mayor riesgo de IC y de bloqueos intracardiacos
	$\beta$ -bloqueantes, diltiazem, verapamilo	Mayor riesgo bradicardia, bloqueo AV e IC
Propafenona	Inhibidores de CYP2D6 (quinidina y fluoxetinal)	Aumentan las Cp de flecainida
	Digoxina	Mayor riesgo de bradicardia y bloqueo AV
	FAA del grupo Ia	Mayor riesgo de insuficiencia cardiaca y de bloqueos intracardiacos

**Tabla 16. Interacciones medicamentosas de los FAA de clase Ic.** AV: aurículo-ventricular. Cp: concentraciones plasmáticas. FAA: fármacos antiarrítmicos. IC: insuficiencia cardiaca

#### 5.2.2.e. Efectos sobre las corrientes cardiacas

- Efecto sobre la  $I_{Na}$

La flecainida inhibe la  $I_{Na}$  a concentraciones terapéuticas ( $IC_{50} = 1.2 \mu M$ ) (Anno y Hondeghem, 1990; Follmer y Colatsky, 1990). A concentraciones supraterapéuticas ( $IC_{50} = 19 \mu M$ ), inhibe la entrada de  $Na^+$  que se produce durante la fase de meseta del potencial de acción ( $I_{Na,L}$ ). Como consecuencia, la flecainida disminuye la velocidad máxima de despolarización ( $V_{max}$ , un índice indirecto de la  $I_{Na}$ ) de los potenciales de acción registrados en células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema His-Purkinje (Roden y Woosley, 1986; Tamargo y cols., 2011; Alliot y cols., 2011; Tamargo y cols., 2012).

La flecainida presenta una alta afinidad por el estado activo-abierto de los canales de  $Na^+$  y prolonga marcadamente el tiempo de reactivación de los mismos durante la diástole (constante de tiempo de reactivación  $> 6$  s) (Holmes y Heel, 1986; Tamargo y cols., 2012). Esta marcada prolongación de la reactivación explica por qué la flecainida disminuye la excitabilidad y la velocidad de conducción intra-auricular e intra-ventricular (prolongan el periodo refractario y el QRS del ECG) incluso cuando el paciente está en ritmo sinusal, y por qué prolonga el PRE auricular y ventricular más de lo que dura el PA ( $PRE/DPA > 1$ ) (Alliot y cols., 2011; Tamargo y cols., 2012). Como consecuencia, el bloqueo de la  $I_{Na}$  producido por

la flecainida aumenta (Campbell y Vaughan Williams, 1983; Follmer y Colatsky, 1990; Tamargo y cols., 1992): 1) a frecuencias rápidas de estimulación ("bloqueo frecuencia-dependiente"), ya que en estas circunstancias aumenta el tiempo que los canales de  $\text{Na}^+$  pasan en estado activo y/o inactivo y se acorta la diástole (durante el cual se produce la reactivación del canal), por lo que el siguiente latido de la taquicardia aparece antes de que los canales se hayan reactivado y, por tanto, no se conduce. 2) En células cardiacas parcialmente despolarizadas (isquemia, hiperpotasemia), ya que en estas circunstancias se retrasa aún más la reactivación del canal  $\text{Na}^+$  ("bloqueo voltaje-dependiente"). Sin embargo, este marcado bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  es responsable de los efectos proarritmogénicos de la flecainida, ya que la depresión de la excitabilidad y de la velocidad de conducción que produce, facilita la aparición de bloqueos intracardiacos y de arritmias por reentrada, particularmente en pacientes con cardiopatías estructurales (cardiopatía isquémica, hipertrofia o insuficiencia cardiaca) o alteraciones previas de la conducción ventricular (bloqueos de rama).

La propafenona también inhibe la  $I_{\text{Na}}$  a concentraciones terapéuticas ( $\text{IC}_{50} = 1.5 \mu\text{M}$ ), por lo que deprime la excitabilidad y disminuye la  $V_{\text{max}}$  auricular y ventricular sin producir cambios en la amplitud o el PR (Dukes y Vaughan Williams, 1984; Delgado y cols., 1984; Calleja y cols., 1985, Delgado y cols., 1985). La propafenona prolonga marcadamente la reactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  (constante de tiempo de reactivación  $> 6$  s) motivo por el que se le considera un fármaco del grupo Ic, y prolonga también el PRE (Kohlhardt y Seifert, 1980; Kohlhardt y cols., 1983; Delgado y cols., 1985). La propafenona, al igual que la flecainida, inhibe la  $I_{\text{Na}}$  tanto de forma tónica como frecuencia-dependiente. Las cinéticas de aparición y recuperación del bloqueo frecuencia-dependiente producido por propafenona son extremadamente lentas, lo que provoca un considerable grado de bloqueo incluso a bajas frecuencias de estimulación (Kohlhardt, 1984; Kohlhardt y Fitchner, 1988). Además de este bloqueo frecuencia-dependiente, también se ha observado un bloqueo voltaje-dependiente, pues la despolarización del potencial de reposo aumenta la inhibición producida por propafenona en un 60% (Kohlhardt y cols., 1983; Kohlhardt, 1984).

Al igual que la flecainida, la propafenona también acorta la DPA en las fibras de Purkinje, lo que indica una posible inhibición de la  $I_{\text{Na,L}}$  (Ledda y cols., 1981).

- Efecto sobre la  $I_{\text{Ca}}$

La flecainida produce un bloqueo tónico de la  $I_{\text{Ca}}$  registrada en miocitos ventriculares de rana (Scamps y cols., 1989), aunque la sensibilidad de esta corriente al fármaco ( $\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$ ) es mucho menor que la sensibilidad de la  $I_{\text{Na}}$  al mismo. La flecainida no parece producir

un bloqueo dependiente del uso evidente, lo que implica una asociación muy rápida con el estado abierto del canal (Scamps y cols., 1989). Por el contrario, la propafenona produce muy poca o ninguna inhibición tónica sobre la  $I_{Ca}$  registrada en miocitos ventriculares de cobayo, aunque sí produce una marcada inhibición dependiente de voltaje y de la frecuencia de estimulación ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ) (Delgado y cols., 1993). La propafenona desplaza la curva de inactivación hacia potenciales más negativos, evidenciando una mayor afinidad por el estado inactivo del canal. Esta mayor afinidad por el estado inactivo retrasa la recuperación de la inactivación, lo que explica también la dependencia de uso del bloqueo (Delgado y cols., 1993; Hancox y cols., 1997).

- Efecto sobre la  $I_{to}$

Se ha descrito que la flecainida inhibe la  $I_{to}$  ( $IC_{50} = 2.5 \mu M$ ) tanto en miocitos auriculares como ventriculares humanos a concentraciones terapéuticamente relevantes (Wang y cols., 1995b; Radicke y cols., 2008) debido al bloqueo de los estados abierto e inactivo de los canales Kv4 (Wang y cols., 1995b; Yeola y Snyders, 1997). De hecho, la elevada afinidad de este fármaco por el estado inactivo desplaza la curva de inactivación del canal hacia potenciales más negativos (Wang y cols., 1995b). Aunque la interacción con las distintas subunidades  $\beta$  que interaccionan con el canal Kv4.3 no modifica la potencia de bloqueo de la flecainida (Radicke y cols., 2008) si se ha observado una disminución del bloqueo al aumentar la acidosis extracelular (Singarayar y cols., 2003). La corriente generada exclusivamente por canales Kv4.2 (que presentan la misma distribución que la  $I_{to}$  ventricular en ratas) también es inhibida por flecainida ( $IC_{50} = 23.6 \mu M$ ). En estos canales, la flecainida se une sólo al estado inactivo, y en la interacción están implicadas la V402 y la V404, dado que sustitución de estos residuos por Ile, elimina la dependencia de voltaje del bloqueo inducido por flecainida (Caballero y cols., 2003).

La inhibición de la  $I_{to}$  inducida por propafenona en miocitos auriculares humanos también aparece a concentraciones clínicamente relevantes ( $IC_{50} = 4.9 \mu M$ ) (Seki y cols., 1999). La propafenona requiere que el canal esté en estado abierto para producir el bloqueo, dado que éste fármaco acelera la constante de inactivación de forma dependiente de concentración y el bloqueo aumenta al aumentar el tiempo de la despolarización, coincidiendo con la apertura de los canales. Sin embargo, la propafenona no produce ningún efecto evidente sobre el estado inactivo del canal, ni sobre su reactivación (Duan y cols., 1993; Seki y cols., 1999).

- Efecto sobre la  $I_{Kur}$

La flecainida no ejerce ningún efecto sobre la  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos (Wang y cols., 1995b). Sorprendentemente, éste fármaco sí que inhibe la  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares de perro ( $IC_{50} = 3 \mu M$ ), al unirse preferentemente al estado abierto del canal (Yue y cols., 2000). Herrera y cols., estudiaron la unión de la flecainida sobre diversos canales Kv, para intentar determinar las bases moleculares de la distinta sensibilidad de los canales Kv a la flecainida. Mediante mutagénesis dirigida, los autores observaron que la sustitución I502L en el dominio transmembrana S6 del canal Kv1.5 humano, aumenta marcadamente la sensibilidad de los canales humanos a la flecainida de la corriente generada por estos canales (Herrera y cols., 2005), mientras que la mutación inversa, L392I, en los canales Kv4.2 los hace insensibles a la acción de éste fármaco (Herrera y cols., 2005). Recientemente, se ha descrito mediante un modelado molecular, una probable conformación dentro del poro de los canales Kv1.5, donde el grupo cargado de la flecainida se sitúa en una región cargada negativamente, mientras que un grupo trifluorometilo interacciona directamente con la I502. Presumiblemente, la presencia de una Leu en esta posición hace más fuerte esta interacción, bloqueando el canal Kv1.5 (Tikhonov y Zhorov, 2014).

En miocitos auriculares humanos se ha descrito que la propafenona inhibe la  $I_{Kur}$  ( $IC_{50} = 8.6 \mu M$ ) de forma independiente de voltaje y uso (Seki y cols., 1999). Sin embargo, mediante el registro de la corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados de forma estable en células *Ltk*<sup>-</sup>, se ha observado que tanto la propafenona, como su principal metabolito, la 5-OH-propafenona, bloquean estos canales de forma dependiente de voltaje (Franqueza y cols., 1998). Ambos compuestos aceleran la activación e inducen una rápida disminución de la corriente durante la despolarización que se superpone a la lenta inactivación que caracteriza a estos canales. Por lo tanto, esto indica que la propafenona se une a los canales Kv1.5 preferentemente en estado abierto. Además, el cálculo del valor de la distancia eléctrica fraccional (es decir, la fracción del campo eléctrico percibida por una sola carga en el sitio de unión), indica que tanto la propafenona como su metabolito comparten el mismo sitio de unión que el de los anestésicos locales, antihistamínicos y otros antiarrítmicos (Franqueza y cols., 1998).

- Efecto sobre la  $I_{Kr}$

El componente rápido de la corriente rectificadora tardía es inhibido a concentraciones clínicamente relevantes tanto por la flecainida como por la propafenona, siendo más sensible a la propafenona ( $IC_{50} = 3.91 \mu M$  y  $IC_{50} = 0.44 \mu M$  respectivamente, medido en la corriente

generada por canales Kv11.1 expresados en células HEK) (Follmer y cols., 1992; Duan y cols., 1993; Delpón y cols., 1995; Wang y cols., 1996b; Mergenthaler y cols., 2001; Paul y cols., 2002). Ambos compuestos producen un bloqueo dependiente de voltaje y tiempo, lo que implica una unión preferente al estado abierto del canal (Paul y cols., 2002; Arias y cols., 2003). La propafenona, además, también tiene afinidad por el estado inactivo del canal, lo que acelera la cinética de inactivación de Kv11.1. Los metabolitos de la propafenona poseen unas características de bloqueo similares a los de la propafenona (Arias y cols., 2003; Cahill y Gross, 2004), aunque la 5-OH-propafenona tiene una mayor afinidad por el estado abierto que el compuesto padre (Arias y cols., 2003). Además, tanto la propafenona como su metabolito principal podrían interactuar con el estado cerrado del canal, lo que explicaría el bloqueo instantáneo que aparece al inicio de los pulsos despolarizantes (Arias y cols., 2003). El modelo propuesto para el bloqueo inducido por propafenona de los canales Kv11.1 implica una fuerte interacción con el anillo aromático de la F565 y una interacción más débil con la Y652 situadas en el dominio transmembrana S6 (Witchel y cols., 2004). Según este modelo, tras el cierre del canal, el fármaco quedaría atrapado en el sitio de unión del canal. Posteriormente, el fármaco se liberaría de su unión con la F565, posicionándose en la cavidad interna. Por último, la reactivación del canal permitiría la salida del fármaco de la cavidad interna (Witchel y cols., 2004). En este modelo no sería necesario una interacción con el estado inactivo del canal, aunque ésta sería posible en tanto que la afinidad por el estado inactivo es equivalente a la del estado abierto (Witchel y cols., 2004). Los resultados demuestran que la fracción de campo eléctrico transmembrana sentido por la forma cargada de la propafenona (forma activa) cuando está unida a su receptor en el poro es de 0.2. Dicha forma cargada accede al receptor entrando por la boca intracelular del poro del canal (Mergenthaler y cols., 2001; Witchel y cols., 2004).

- Efecto sobre la  $I_{Ks}$

El componente lento de la corriente rectificadora tardía, o  $I_{Ks}$ , no es inhibido por la flecainida (Wang y cols., 1996b). Sin embargo, la propafenona sí que inhibe esta corriente, aunque en menor grado que la  $I_{Kr}$  (Delpón y cols., 1995). Este bloqueo parece estar asociado con la apertura del canal y aumenta al aumentar la frecuencia de estimulación. La propafenona ejerce un bloqueo tanto tónico como dependiente del uso que se desarrolla más rápidamente que la propia activación del canal (Delpón y cols., 1995). Por todo ello se concluye que la propafenona bloquea el canal preferentemente cuando éste transita desde el estado cerrado al estado abierto.

- Efecto sobre las corrientes rectificadoras internas

Solamente la corriente de salida de la  $I_{K,ATP}$  registrada en miocitos ventriculares de cobayo es inhibida por la flecainida ( $IC_{50} = 17.3 \mu M$ ) de forma dependiente de la concentración (Wang y cols., 1995c). Por ello, se ha propuesto que la flecainida podría bloquear los canales Kir6.2 de forma parecida a como lo hacen los cationes divalentes en el mecanismo de rectificación interna (Wang y cols., 1995c). Sin embargo, el efecto de la flecainida sobre la misma corriente registrada en miocitos uretrales de cerdo, es distinto, ya que inhibe tanto la corriente de salida como de entrada (Yunoki y cols., 2001). La disminución del pH, hace que la  $I_{K,ATP}$  sea menos sensible a la inhibición inducida por flecainida (Wang y cols., 1995c; Yunoki y cols., 2001). La  $I_{K,ACh}$  es inhibida tanto por la flecainida como por la propafenona ( $IC_{50} = 3.6 \mu M$  e  $IC_{50} = 0.3 \mu M$  respectivamente, en miocitos ventriculares de cobayo). Se ha propuesto que ambos fármacos reducen la  $I_{K,ACh}$  bloqueando directamente el estado abierto de los canales de  $K^+$  muscarínicos (Inomata y cols., 1993; Walsh, 2010).

Los estudios previos no han observado ningún efecto de la flecainida sobre la  $I_{K1}$ , aunque las dosis usadas siempre han sido mayores o mucho mayores de  $1 \mu M$ , por lo que se desconoce su efecto a concentraciones del rango terapéutico (Follmer y Colatsky, 1990; Yamashita y cols., 1995). Por otra parte, Duan y cols. (1993), estudiaron el efecto de la propafenona sobre la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares de conejo y observaron que éste fármaco inhibe el 30, 45 y 55% de la corriente medida a  $-110 mV$  a concentraciones de 1, 5 y  $10 \mu M$ , respectivamente. Sin embargo, los autores no profundizaron en el mecanismo responsable del efecto debido al “complejo comportamiento de la  $I_{K1}$ ” (Duan y cols., 1993).





## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



La  $I_{K1}$  cardiaca humana es la corriente que determina que el potencial de reposo de los miocitos se estabilice cerca del potencial de inversión del  $K^+$ . Además determina la fase final de repolarización del PA (fase 3), por lo que es una corriente que determina de forma crítica el periodo refractario. Los canales que generan esta corriente (Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3) se pueden ensamblar en forma de homo o heterotetrámeros, modificando las características de la  $I_{K1}$ . Se ha descrito que en humanos, Kir2.1 es la isoforma predominante en el tejido ventricular, mientras que a nivel auricular la expresión de Kir2.2 y Kir2.3 es importante.

Los canales Kir2.x están implicados en la perpetuación de taquiarritmias reentrantes tanto en humanos como en modelos experimentales. Además mutantes tanto de pérdida como de ganancia de función del gen que codifica a Kir2.1 que provocan una disminución o un aumento de  $I_{K1}$  respectivamente, están asociados a arritmias ventriculares. De hecho, las mutaciones que aumentan el componente de salida del  $I_{K1}$  provocan un síndrome de QT corto tipo 3 y arritmias ventriculares severas, mientras que aquellas mutaciones que lo disminuyen causan una prolongación del QT y también generan arritmias ventriculares (Síndrome de Andersen-Tawil). Además, se ha descrito que un aumento de la  $I_{K1}$  podría ser el origen de la fibrilación auricular y ventricular. Este tipo de arritmias se caracterizan por una actividad eléctrica rápida y turbulenta que da lugar a la pérdida de función contráctil por parte del miocardio. Está ampliamente aceptado que las arritmias fibrilatorias se generan por la “reentrada” de impulso cardiaco en forma de rotores y se ha descrito que el aumento en la amplitud de  $I_{K1}$  es un factor crítico que incide en el aumento en la frecuencia y la estabilidad de estos rotores. Se ha propuesto que la modulación selectiva de los canales Kir2.x, para conseguir un bloqueo de  $I_{K1}$  a nivel auricular pero no a nivel ventricular, podría ser una estrategia eficaz para el tratamiento la fibrilación auricular.

En la actualidad, hay una enorme cantidad de información sobre la farmacología de las corrientes cardiacas humanas de  $K^+$  voltaje-dependientes. Se sabe, por ejemplo que mientras las toxinas se unen a la boca extracelular del poro, los fármacos que bloquean estos canales, se unen al estado abierto del canal en sitios de unión que con topología similar situados en la luz del poro. Sin embargo, la farmacología de los canales Kir2.x está en un estado de incipiente desarrollo. Se ha descrito que la cloroquina inhibe  $I_{K1}$  de forma dependiente de voltaje al unirse a distintos residuos del poro citoplasmático de Kir2.1 y que están implicados en la unión a poliaminas. Otros fármacos, como el tamoxifeno, la mefloquina y el carvedilol inhiben la  $I_{K1}$  al unirse a  $PIP_2$ , impidiendo la interacción crítica y necesaria entre el canal y este mediador.

La flecainida y la propafenona actúan como fármacos antiarrítmicos de clase Ic, bloqueando los canales de  $Na^+$ . Debido a esta característica son usados como fármacos de

elección para el tratamiento agudo de la FA de reciente comienzo (menos de 48 horas), consiguiendo cardioversión a RS en un elevado porcentaje de los casos. Sin embargo, los antiarrítmicos de clase Ic se han asociado con un marcado aumento del riesgo de arritmias ventriculares. De hecho, se ha descrito que tanto flecainida como la propafenona aumentan la DPA y el periodo refractario a nivel auricular pero no ventricular, diferencias no explicables por sus efectos sobre los canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes. Por otra parte, se ha descrito que la propafenona es capaz de bloquear la  $I_{\text{K1}}$  en miocitos de conejo. Sin embargo, hoy en día se desconocen los determinantes moleculares de la modulación que ejercen la flecainida y la propafenona sobre los canales que generan la  $I_{\text{K1}}$  humana.

Nuestra hipótesis de partida es que éstos fármacos antiarrítmicos de clase Ic modulan los canales que generan la  $I_{\text{K1}}$  humana y además, que producen efectos distintos sobre cada uno de los canales Kir2.x que justificarían sus acciones antiarrítmicas auriculares y proarrítmicas ventriculares.

Por todo ello los **OBJETIVOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** fueron:

1. Analizar los efectos producidos por la flecainida sobre las corrientes generadas por los canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 humanos registrados en sistemas de expresión heterólogos y sobre la  $I_{\text{K1}}$  auricular humana.
2. Identificar el/los sitios de unión de la flecainida al canal y describir el mecanismo mediante el cual dicha unión provoca los efectos observados.
3. Analizar los efectos producidos por la propafenona sobre las corrientes generadas por los canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 humanos registrados en un sistemas de expresión heterólogos y sobre la  $I_{\text{K1}}$  auricular humana.
4. Identificar el/los sitios de unión de la propafenona al canal y describir el mecanismo mediante el cuales dicha unión provoca los efectos producidos.

### **III. RESULTADOS**



## **1. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification**

Caballero R, **Dolz-Gaitón P**, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:15631-15636





# Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification

Ricardo Caballero<sup>a,1</sup>, Pablo Dolz-Gaitón<sup>a,1</sup>, Ricardo Gómez<sup>a,2</sup>, Irene Amorós<sup>a</sup>, Adriana Barana<sup>a</sup>, Marta González de la Fuente<sup>a</sup>, Lourdes Osuna<sup>a</sup>, Juan Duarte<sup>b</sup>, Angelica López-Izquierdo<sup>c</sup>, Ignacio Moraleda<sup>d</sup>, Enrique Gálvez<sup>d</sup>, José Antonio Sánchez-Chapula<sup>c</sup>, Juan Tamargo<sup>a</sup>, and Eva Delpón<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain; <sup>b</sup>Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; <sup>c</sup>Unidad de Investigación Carlos Méndez, Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, 28045 Colima, Mexico; and <sup>d</sup>Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Spain

Edited by Lily Yeh Jan, University of California, San Francisco, CA, and approved July 23, 2010 (received for review March 25, 2010)

**Both increase and decrease of cardiac inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) are associated with severe cardiac arrhythmias. Flecainide, a widely used antiarrhythmic drug, exhibits ventricular proarrhythmic effects while effectively controlling ventricular arrhythmias associated with mutations in the gene encoding Kir2.1 channels that decrease  $I_{K1}$  (Andersen syndrome). Here we characterize the electrophysiological and molecular basis of the flecainide-induced increase of the current generated by Kir2.1 channels ( $I_{Kir2.1}$ ) and  $I_{K1}$  recorded in ventricular myocytes. Flecainide increases outward  $I_{Kir2.1}$  generated by homotetrameric Kir2.1 channels by decreasing their affinity for intracellular polyamines, which reduces the inward rectification of the current. Flecainide interacts with the HI loop of the cytoplasmic domain of the channel, Cys311 being critical for the effect. This explains why flecainide does not increase  $I_{Kir2.2}$  and  $I_{Kir2.3}$ , because Kir2.2 and Kir2.3 channels do not exhibit a Cys residue at the equivalent position. We further show that incubation with flecainide increases expression of functional Kir2.1 channels in the membrane, an effect also determined by Cys311. Indeed, flecainide pharmacologically rescues R67W, but not R218W, channel mutations found in Andersen syndrome patients. Moreover, our findings provide noteworthy clues about the structural determinants of the C terminus cytoplasmic domain of Kir2.1 channels involved in the control of gating and rectification.**

cardiac  $I_{K1}$  | Kir2.2 channel | Kir2.3 channel | Andersen mutations | inward rectifying channel

The cardiac inwardly rectifying  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) stabilizes resting membrane potential (RMP) close to the reversal potential of  $K^+$  ( $E_K$ ) and shapes the final repolarization phase of the action potential (AP) (1). Three inwardly rectifying channels (Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3) contribute to  $I_{K1}$  in the human heart assembled as homo- and/or heterotetramers (2). Experimental data suggest that in humans, Kir2.1 is the major isoform underlying ventricular  $I_{K1}$ , whereas its relative contribution to atrial  $I_{K1}$  seems to be lower (3). The strong inward rectification of Kir2.x channels, i.e., the preferential conduction of inward compared with outward current, depends on the binding of intracellular  $Mg^{2+}$  and polyamines to the cytoplasmic pore and to the inner vestibule of the channel (4).

Gain- and loss-of-function mutations in the gene that encodes Kir2.1 (KCNJ2) have been reported, and both the  $I_{K1}$  increase and decrease produced by these mutations are associated with severe ventricular arrhythmias (1). Furthermore, experimental data showed that as the amplitude of the outward component of the  $I_{K1}$  increases, the frequency of the fast and stable reentry of spiral waves (rotors) increases. Indeed, the importance of  $I_{K1}$  in the establishment of rotors and ventricular fibrillation dynamics has been shown (5).

Flecainide is a class I antiarrhythmic drug that, besides its  $Na^+$  channel-blocking properties, exhibits class III antiarrhythmic effects [i.e., prolongs AP duration (APD) and refractoriness] at the atrial but not at the ventricular level (6, 7). Flecainide is widely used to suppress recent onset atrial fibrillation (AF) (8), though it is associated with an increased risk of ventricular proarrhythmia, especially

in patients with coronary artery disease and/or heart failure. Conversely, in a limited number of patients, it has been reported that flecainide is effective in controlling ventricular tachycardia associated with the autosomal dominant trait Andersen syndrome (AS), which is produced by loss-of-function mutations in KCNJ2 (9, 10).

We hypothesized that a putative differential flecainide effect on atrial and ventricular  $I_{K1}$  (blockade of atrial and increase of ventricular  $I_{K1}$ ) can account for the selective prolongation of the atrial APD, the ventricular proarrhythmic effects, and the antiarrhythmic effects in the AS patients. Therefore, we have analyzed the flecainide effects on the currents generated by human WT and mutated Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 channels ( $I_{Kir2.x}$ ) and compared its effects on atrial and ventricular  $I_{K1}$ . Acutely applied flecainide selectively increased ventricular  $I_{K1}$  and  $I_{Kir2.1}$ , an effect determined by the presence of Cys311 at the cytoplasmic domain of Kir2.1 channels. Binding of flecainide reduced the Kir2.1 polyamine blockade, thus reducing the inward rectification. Additionally, incubation with flecainide increased functional ion channel density, an effect also determined by Cys311. Overall, the findings show that Kir2.1 channels can be affected through the pharmacological modulation of their polyamine blockade by a therapeutically used drug.

## Results

**Flecainide Increases Kir2.1 Currents.** Figure 1A shows  $I_{Kir2.1}$  traces recorded in transiently transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells by applying 250-ms pulses from  $-60$  mV to potentials ranging  $-120$  and  $+20$  mV in the absence and presence of  $1 \mu M$  flecainide. Flecainide increased  $I_{Kir2.1}$  at voltages negative ( $16.5 \pm 2.4\%$  at  $-120$  mV) and, more importantly, at voltages positive to  $E_K$  ( $45.8 \pm 9.8\%$  at  $-50$  mV,  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 1A and B). These effects were completely reversible upon washout (Fig. S1). The concentration that produces the half-maximum effect ( $EC_{50}$ ) and the maximum effect ( $E_{max}$ ) were calculated by fitting the Hill equation to the increase produced by different flecainide concentrations and averaged  $0.8 \pm 0.01 \mu M$  ( $n_H = 1.6 \pm 0.4$ ) and  $22 \pm 1.9\%$  at  $-120$  mV, respectively (Fig. S1). At  $-50$  mV, the  $EC_{50}$  and the  $E_{max}$  averaged  $0.4 \pm 0.01 \mu M$  ( $n_H = 2.2 \pm 0.2$ ) and  $53.9 \pm 3.6\%$ , respectively (Fig. S1). Therefore, flecainide preferentially increased the outward  $I_{Kir2.1}$  generated at physiological potentials.

Author contributions: R.C., J.T., and E.D. designed research; R.C., P.D.-G., R.G., I.A., A.B., M.G.d.I.F., L.O., J.D., A.L.-I., I.M., E.G., and J.A.S.-C. performed research; R.C., P.D.-G., R.G., I.A., A.B., M.G.d.I.F., and J.A.S.-C. analyzed data; and J.T. and E.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

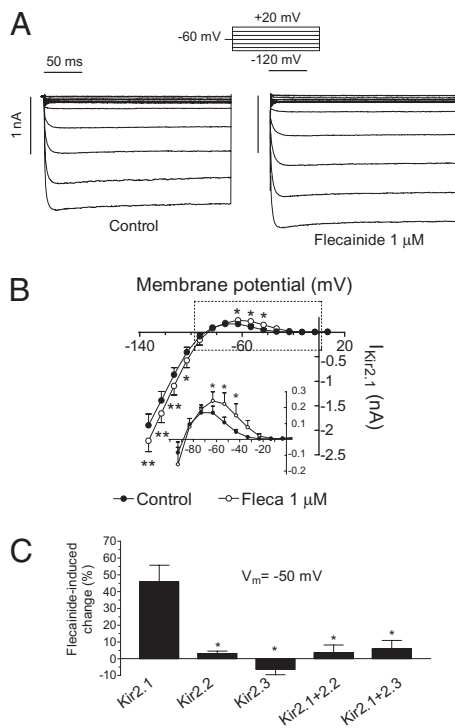
This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

<sup>1</sup>R.C. and P.D.-G. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: ricardo.gomez@med.ucm.es.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1004021107/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1004021107/-DCSupplemental).

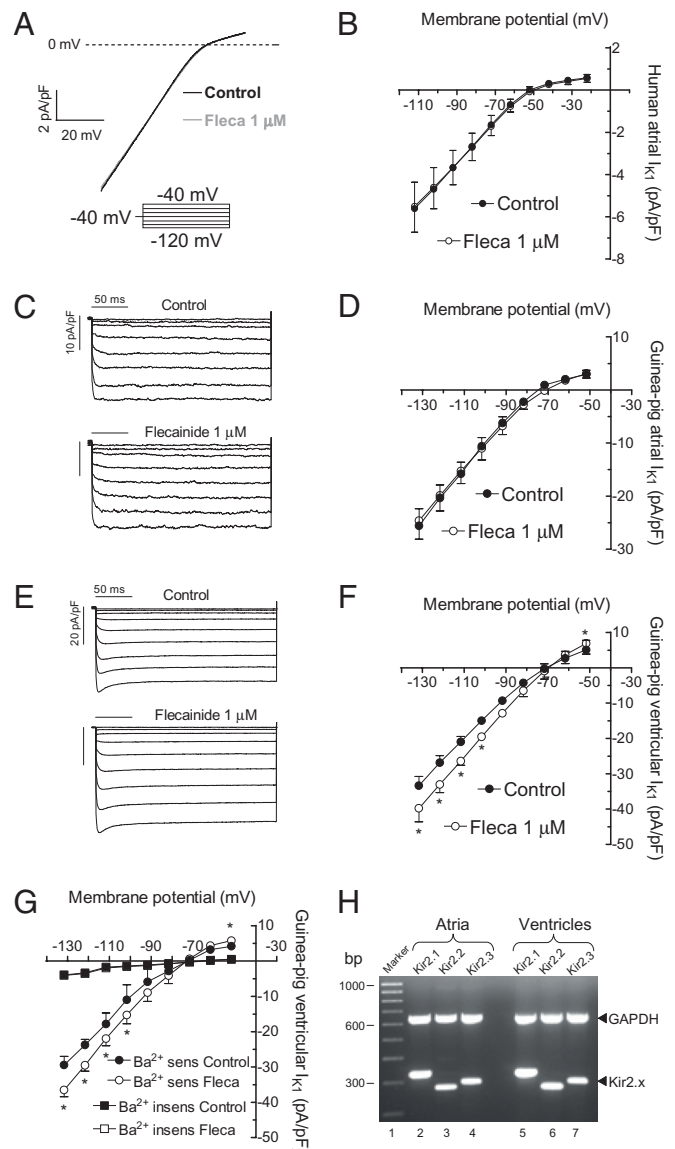


**Fig. 1.** Flecainide increases  $I_{Kir2.1}$ . (A)  $I_{Kir2.1}$  traces recorded by applying the protocol shown in the absence and presence of flecainide. (B) I-V curves for currents measured at the end of the pulses. (Inset) Data at potentials positive to  $E_K$  in an expanded scale. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. control. (C) Flecainide-induced change on the current recorded at  $-50$  mV in cells expressing homotetramers of Kir2.1, Kir2.2, or Kir2.3 channels or heterotetramers of Kir2.1 + Kir2.2 and Kir2.1 + Kir2.3. \* $P < 0.05$  vs. Kir2.1. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of five or more experiments.

To determine the effect of flecainide in a physiologically relevant setting, we used an epicardial AP voltage-clamp protocol (Fig. S2). Under these conditions, flecainide increased the charge crossing the membrane estimated from the integral of the current traces, reaching  $137 \pm 28\%$  at  $1 \mu\text{M}$  ( $n = 8$ ; Fig. S2).

**Flecainide Does Not Modify Kir2.2 and Kir2.3 Currents.** Because Kir2.2 and Kir2.3 proteins also contribute to cardiac  $I_{K1}$ , the effects of flecainide on these channels were studied. The findings showed that flecainide failed to modify  $I_{Kir2.2}$  and  $I_{Kir2.3}$  ( $P > 0.05$  vs. control,  $n = 10$ ; Fig. 1C and Fig. S3). We also studied the flecainide effects on cells cotransfected (1:1 ratio) with both Kir2.1 and Kir2.2 (Kir2.1/Kir2.2) and with Kir2.1 and Kir2.3 (Kir2.1/Kir2.3). Kir2.1/Kir2.2 and Kir2.1/Kir2.3 currents displayed activation kinetics significantly different from those of the respective homotetrameric channels (Fig. S4), demonstrating the heterotetrameric nature of the channels. Under these conditions, flecainide failed to increase inward and outward currents ( $P > 0.05$  vs. control,  $n = 10$ ; Fig. 1C and Fig. S4), demonstrating that its effects were only apparent in channels composed of four Kir2.1 subunits.

**Flecainide Increases  $I_{K1}$  in Ventricular but Not in Atrial Myocytes.** Considering that flecainide selectively increases  $I_{Kir2.1}$ , we surmised that flecainide will differentially affect atrial and ventricular  $I_{K1}$ . Figure 2 A and B show original recordings and mean I-V relationships for  $I_{K1}$  obtained in isolated human atrial myocytes by applying a voltage ramp from  $-100$  to  $-10$  mV in the absence and presence of flecainide ( $1 \mu\text{M}$ ). Flecainide did not modify either the inward ( $-5.5 \pm 1.2$  vs.  $-5.6 \pm 1.2$  pA/pF at  $-100$  mV;  $P > 0.05$ ,  $n = 5$ ) or outward ( $0.5 \pm 0.1$  vs.  $0.6 \pm 0.1$  pA/pF at  $-10$  mV;  $P > 0.05$ ) current.



**Fig. 2.** Flecainide increases ventricular but not atrial  $I_{K1}$ . Voltage ramp (800 ms) from  $-100$  to  $-10$  mV (A) and I-V curves (B) for human atrial  $I_{K1}$  in the absence and presence of flecainide. Representative  $I_{K1}$  traces recorded in guinea-pig atrial (C) or ventricular (E) myocytes by applying the protocol shown. I-V curves for guinea-pig atrial (D) or ventricular (F)  $I_{K1}$ . (G) I-V of the  $\text{Ba}^{2+}$ -sensitive and  $\text{Ba}^{2+}$ -insensitive currents recorded in ventricular myocytes before and after application of flecainide. (H) mRNA expression level of Kir2.x channels in guinea-pig atrial and ventricular samples. First lane shows molecular weight marker (1,000–100 bp). Lanes 2–4 and 5–7 show Kir2.1 (325 bp), Kir2.2 (291 bp), and Kir2.3 (303 bp) mRNA expression in atrial and ventricular tissue, respectively. GAPDH gene was used as internal standard. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of four experiments in each group. \* $P < 0.05$  vs. control.

Because human ventricular myocytes were not available, we compared the effects of flecainide on the  $I_{K1}$  recorded in guinea-pig atrial and ventricular myocytes (Fig. 2 C–F). As in humans, in guinea-pig ventricles, Kir2.1 expression is higher than in the atria (1, 11, 12). In ventricular myocytes,  $1 \mu\text{M}$  flecainide significantly increased both the inward ( $19.5 \pm 3.2\%$  at  $-120$  mV) and outward ( $38.0 \pm 9.5\%$  at  $-40$  mV) current ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) without modifying atrial  $I_{K1}$  ( $P > 0.05$ ,  $n = 4$ ; Fig. 2 C–F). All these experiments were performed in the presence of atropine ( $1 \mu\text{M}$ ) and glibenclamide ( $10 \mu\text{M}$ ) to block the acetylcholine-activated component ( $I_{K\text{ACH}}$ ) and the ATP-sensitive ( $I_{K\text{ATP}}$ ) inward rectifier currents,

respectively. Identical findings were obtained when the ventricular  $I_{K1}$  was measured as the  $Ba^{2+}$ -sensitive current (Fig. 2G).

A previous report proposed that Kir2.1 is the only Kir2.x channel expressed in guinea-pig atria (11). Conversely, our findings suggested that guinea-pig ventricular  $I_{K1}$  is mainly carried by Kir2.1 homotetramers, whereas Kir2.x heterotetramers generate atrial  $I_{K1}$ . For testing whether Kir2.1 is the only Kir2.x channel present in the atria, we analyzed the mRNA expression of Kir2.x in guinea-pig atria and ventricles. In agreement with another report (12), we could detect Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 mRNA in both the atria and the ventricles (Fig. 2H).

**Flecainide Increases Open Probability of Kir2.1 Channels.** Figure 3A shows single-channel recordings in a CHO cell expressing Kir2.1 channels by applying 10-s pulses to  $-80$  mV from a holding potential of  $0$  mV in the absence and presence of  $1 \mu\text{M}$  flecainide. In control conditions, Kir2.1 channel activity was characterized by few and long events, leading to an opening frequency ( $f_o$ ) of  $2.0 \pm 0.1$  Hz and a mean open probability ( $P_o$ ) of  $0.27 \pm 0.01$  ( $n = 6$ ; Fig. 3D and E). Flecainide did not modify unitary current amplitude (Fig. 3B) but changed channel gating by significantly increasing the mean open time and  $f_o$  (Fig. 3C and D), which eventually resulted in

a significant increase in the  $P_o$  (Fig. 3E). Figure 3F compares the voltage dependence of the  $P_o$  ( $P_o$ -V curves) in control conditions and in the presence of flecainide. As described,  $P_o$  decreased as the membrane potential became more negative (1, 13). Flecainide shifted the midpoint of the curve to more negative potentials (from  $-55.3 \pm 1.8$  to  $-71.1 \pm 2.4$  mV;  $P < 0.05$ ) without modifying the slope. In Fig. 3G, the voltage dependence of the single-channel current amplitude is depicted. Flecainide did not modify the slope conductance values ( $\gamma = 34.7 \pm 1.7$  pS) yielded by the fit of a linear function to the data. All of these effects resemble those produced by  $PIP_2$  (14), suggesting that flecainide potentiates the activating  $PIP_2$  effects on the channel. To test this hypothesis, we studied the effects of flecainide on L222I Kir2.1 channels, a mutation that decreases the channel affinity for  $PIP_2$  but renders functional channels (14). Fig. S5 shows that the decrease of the channel affinity for  $PIP_2$  suppressed the flecainide  $I_{Kir2.1}$ -increasing effects at potentials negative to the  $E_K$ , whereas increasing effects at positive potentials were still apparent.

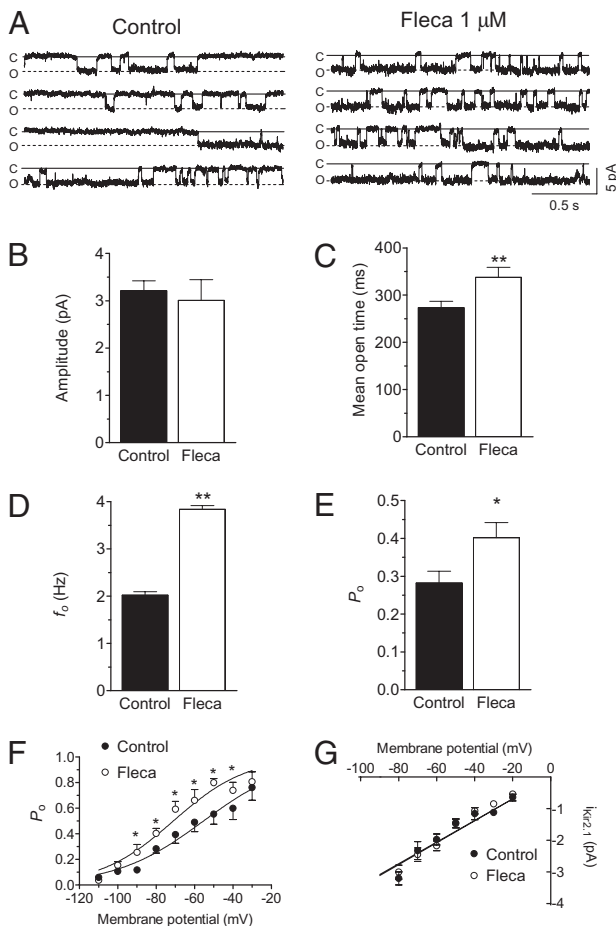
**Flecainide Increases Kir2.1 Currents by Decreasing the Polyamine Blockade.** Figure 4A illustrates the I-V curve normalized to the amplitudes at  $-120$  mV in control conditions and in the presence of  $1 \mu\text{M}$  flecainide at potentials positive to  $E_K$ . As can be observed, flecainide induced a marked increase of the outward  $I_{Kir2.1}$  and shifted the potential at which the outward current peaks, suggesting that it decreased the channel rectification.

The degree of rectification of Kir2.1 channels was estimated as the relative chord conductance ( $G_c$ ; Fig. 4B) in control conditions and in the presence of flecainide. Flecainide shifted the midpoint of the curves to more positive potentials (from  $-91.9 \pm 1.8$  to  $-87.1 \pm 1.8$  and  $-80.5 \pm 1.4$  mV at  $1$  and  $10 \mu\text{M}$  flecainide, respectively;  $P < 0.05$ ) and decreased the steepness of rectification, reflected by a lower  $z$  value in the presence of flecainide ( $2.4 \pm 0.3$  and  $1.6 \pm 0.6$  for  $1$  and  $10 \mu\text{M}$  flecainide, respectively) than in control conditions ( $3.0 \pm 0.5$ ; Fig. 4B).

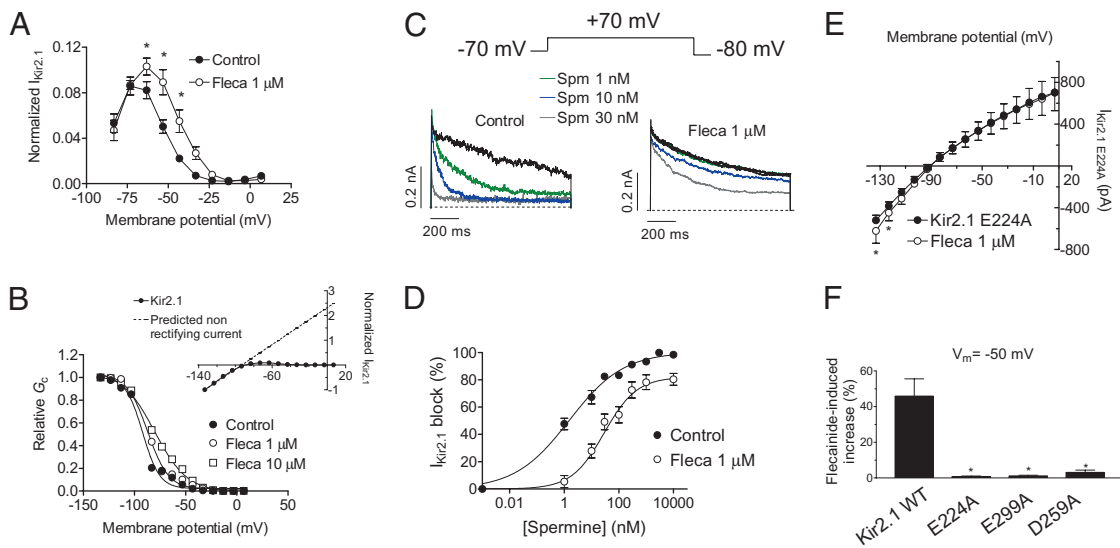
Because the strong rectification of Kir2.1 channels is explained by the voltage-dependent block produced by intracellular polyamines (4), our findings suggested that flecainide decreases the affinity of the channel for polyamines. Therefore, flecainide effects were further tested in excised inside-out macropatches in the presence of increasing concentrations of spermine (Spm,  $1$  nM– $10 \mu\text{M}$ ). Figure 4C shows that in control conditions, Spm produced a concentration-dependent block of the outward current at  $+70$  mV. The concentration that produces the half-maximum inhibition ( $IC_{50}$ ) was  $1.5 \pm 0.1$  nM (Fig. 4D;  $n = 8$ ). In the presence of flecainide ( $1 \mu\text{M}$ ), blockade produced by all of the Spm concentrations tested was decreased, an effect that shifted rightward ( $29.0 \pm 2.1$  nM,  $n = 8$ ) the concentration-effect curve of Spm (Fig. 4D). Importantly, in the presence of flecainide,  $E_{max}$  produced by Spm reached saturation at  $82.1 \pm 5.5\%$ .

Finally, we analyzed the effects of flecainide on E224A, D259A, and E299A Kir2.1 channels, three cytoplasmic residues that are important in determining the extent of Kir2.1 inward rectification (15). Figure 4E shows the E224A I-V relationship in the absence and presence of flecainide. The mutation disrupted the rectification mechanism of the channel and completely abolished the flecainide increase at potentials positive to the  $E_K$ . Identical findings were obtained when analyzing the effects of flecainide on D259A and E299A Kir2.1 channels (Fig. 4F).

**Cys311 Is Critical for the Flecainide-Induced Increase of  $I_{Kir2.1}$ .** To explore the putative binding site of flecainide within Kir2.1 channels, a molecular model was developed. A blind docking for flecainide with a full-length channel composed of the crystal structure of one cytoplasmic domain of Kir2.1 (15) and a modeled trans-membrane domain based on KirBac1.1 crystal structure was performed. The findings showed that the most practical binding site on Kir2.1 channels was located on the  $\beta$ I strand within the C terminus of the cytoplasmic domain (Fig. S6 and Table S1). In contrast, when blind docking was performed on Kir2.2 and Kir2.3, none of the conformations obtained were located on the  $\beta$ I (Fig. S7).



**Fig. 3.** Flecainide  $1 \mu\text{M}$  increases mean open time,  $f_o$ , and  $P_o$  of Kir2.1 channels. (A) Single-channel recordings under control conditions and after perfusion with flecainide. Closed- and open-channel levels are indicated by C and O, respectively. Unitary current amplitude (B), mean open time (C),  $f_o$  (D), and  $P_o$  (E) in the absence and presence of flecainide. (F)  $P_o$ -V in control conditions and in the presence of flecainide. Solid lines represent the fit of a Boltzmann function to the data. (G) Single-channel current-voltage relationships in the absence and presence of flecainide. Solid lines represent the fit of a linear function to the data. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of six experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. control.



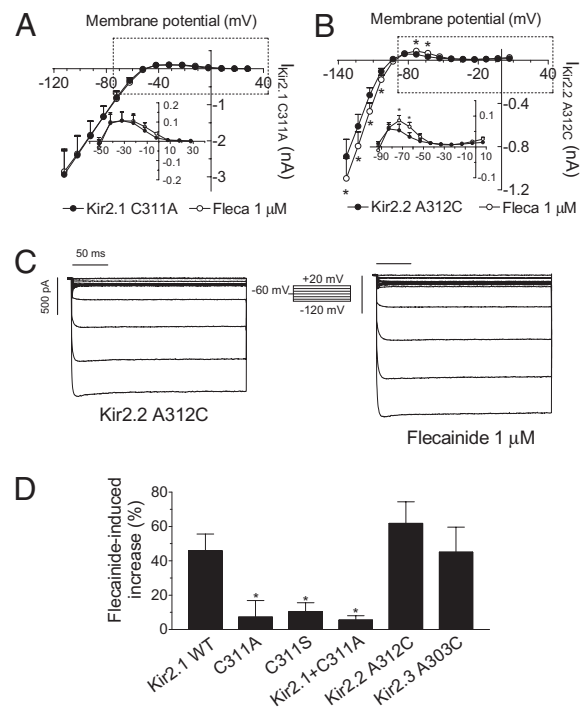
**Fig. 4.** Flecainide decreases polyamine blockade. (A)  $I_{Kir2.1}$  normalized to the amplitudes at  $-120$  mV at potentials positive to  $E_K$  in control conditions and in the presence of flecainide. (B) Mean relative  $G_K$  in control conditions and in the presence of flecainide. Solid lines represent the fit of a Boltzmann function to the data. (Inset) Mean  $I-V$  curve and the current predicted, assuming a linear unblocked current in control conditions. (C) Current traces recorded at  $+70$  mV in excised inside-out patches from HEK-293 cells expressing Kir2.1 channels in control conditions and after cytoplasmic surface application of Spm in the absence and presence of flecainide. Dashed lines represent the zero current level. (D) Percentage of current inhibition at  $+70$  mV in excised inside-out patches as a function of Spm concentrations in the absence and presence of flecainide. (E)  $I-V$  curves for E224A Kir2.1 channels in the absence and presence of flecainide. (F) Flecainide-induced change on the current recorded at  $-50$  mV in CHO cells expressing WT, E224A, E299A, and D259A Kir2.1 channels. \* $P < 0.05$  vs. control. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of five or more experiments.

Thereafter, flecainide was manually docked into the Kir2.1  $\beta$  strand. In the lowest-energy pose ( $-11.3$  kcal/mol), flecainide was predicted to bind strongly to Cys311 by forming three hydrogen bridge bonds (one between the carbonyl oxygen atom of flecainide and the thiol group of the Cys residue, and two between the carbonyl oxygen atom of the amino acid and the nitrogen atoms of the amide and of the piperidine groups of flecainide (Fig. S6). Interestingly, the  $\beta$ I strand is highly conserved among Kir2.x channels, Cys311 being the only different residue between Kir2.1 and Kir2.2 and Kir2.3 (Fig. S6).

When Cys311 was substituted by Ala (C311A), the residue present in Kir2.2 and Kir2.3 channels at equivalent position (312 and 303, respectively), the flecainide-induced increase was abolished at potentials negative and positive to  $E_K$  (Fig. 5A and D). Similar findings were obtained when it was substituted by Ser (C311S) (Fig. 5D). Flecainide also failed to increase  $I_{Kir2.1}$  generated in cells cotransfected with both WT and C311A Kir2.1 channels (Fig. 5D). As the Cys-to-Ala substitution abrogates flecainide sensitivity of Kir2.1, a reverse mutation in Kir2.2 and Kir2.3 ought to have the opposite effect. Here we show that this is indeed the case. Flecainide significantly increased the inward and the outward A312C  $I_{Kir2.2}$  (Fig. 5B and C;  $n = 5$ ) and A303C  $I_{Kir2.3}$  (Fig. 5D;  $n = 5$ ). These findings verify and underscore the importance and specificity of the Cys residue for flecainide sensitivity of Kir2.1 channels.

**Flecainide Increases Functional Kir2.1 Channel Density.** To test whether flecainide could also increase the current generated by Kir2.1 channels with AS mutations, we tested the effects of flecainide in R67W and R218W channels—two mutations found in AS patients (16). Flecainide did not increase R67W or R218W currents, which were almost undetectable (Fig. 6A and B). R67W  $I_{Kir2.1}$  markedly increased when increasing the  $[K^+]_o$  to 140 mM (Fig. S8;  $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ), suggesting that channels were present in the plasma membrane. Conversely, R218W channels did not generate any current at 140 mM  $[K^+]_o$  (Fig. S8), even when it has been described that the channels are able to reach the cell membrane (17). Next we tested the effects produced by the incubation of R67W and R218W Kir2.1 transiently transfected cells with flecainide (1  $\mu$ M) for 24 h (Fig. 6C and D). R67W, but not R218W, flecainide-incubated cells generated a small but detectable BaCl<sub>2</sub>-

sensitive current (Fig. S8) that was significantly greater than the current generated by nonincubated cells (Fig. 6E;  $n = 21$ ,  $P < 0.01$ ). Loss of function of R67W and R218W channels has been



**Fig. 5.** Cys311 is critical for the flecainide-induced increase of  $I_{Kir2.1}$ . The  $I-V$  curves for currents recorded in cells expressing C311A Kir2.1 (A) and A312C Kir2.2 (B) channels in the absence and presence of flecainide. (C) Current traces recorded in a cell expressing A312C Kir2.2 channels in control conditions and in the presence of flecainide. (D) Flecainide-induced change on the current recorded at 40 mV positive to  $E_K$  in cells expressing WT or mutant Kir2.x channels. \* $P < 0.05$  vs. control. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of five or more experiments.

attributed to a decreased affinity of the channels for PIP<sub>2</sub> (17); therefore, we also tested the effects of the 24-h incubation with flecainide on L222I channels. Figure 6F shows that flecainide also significantly increased L222I I<sub>Kir2.1</sub> density.

These findings suggested that flecainide increased the functional ion channel density. To test this hypothesis, we incubated Kir2.1 WT transfected cells with flecainide, which significantly increased I<sub>Kir2.1</sub> density (Fig. 6G). Importantly, acute addition of flecainide increased I<sub>Kir2.1</sub> generated by the incubated cells, producing the same increase as in nonincubated cells (42.7 ± 9.5% at -50 mV, n = 4, P < 0.05). This suggests that acute effects of flecainide are additive to its effects on channel density. Conversely, incubation with flecainide did not increase C311A Kir2.1 channel density (Fig. 6H), indicating that the presence of Cys311 is also critical for this effect. Indeed, incubation with flecainide failed to increase density of Kir2.2 and Kir2.3 channels, whereas it increased those of A312C Kir2.2 and

A303C Kir2.3 (Fig. S9). Kir2.1/Kir2.2 and Kir2.1/Kir2.3 densities were also not modified with the flecainide incubation (Fig. S9).

Discussion

Our findings show that flecainide acutely increased human I<sub>Kir2.1</sub> mainly by reducing the polyamine blockade of the channel. Additionally, incubation with flecainide increased functional Kir2.1 channel density. Flecainide did not modify either I<sub>Kir2.2</sub> and I<sub>Kir2.3</sub> or Kir2.2 and Kir2.3 channel density. This selectivity could be attributed to the specific presence of Cys311 on the C terminus of the cytoplasmic region of Kir2.1 channels.

**Flecainide Increases I<sub>Kir2.1</sub> but Not I<sub>Kir2.2</sub> and I<sub>Kir2.3</sub>.** Acutely applied flecainide increased I<sub>Kir2.1</sub>, and this effect was only apparent in Kir2.1 homotetrameric channels. Therefore, flecainide-increasing effects would be apparent only in those species and tissues in which I<sub>K1</sub> is mainly generated by homotetrameric Kir2.1 channels. Thus, our pharmacological findings suggested that guinea-pig ventricular I<sub>K1</sub> is mainly generated by homotetrameric Kir2.1 channels. Recent data showed that Kir2.1 is the major isoform underlying human ventricular I<sub>K1</sub>, whereas its relative contribution to atrial I<sub>K1</sub> seems to be lower (3). This could explain why flecainide did not increase human atrial I<sub>K1</sub>.

Flecainide preferentially increased the outward I<sub>Kir2.1</sub> generated at potentials positive to the E<sub>K</sub>, which influences cardiac RMP, excitability, and APD. Our findings suggested that flecainide decreased polyamines' affinity for the channel in a dose-dependent manner, thus reducing the strength of rectification. Furthermore, the effects of flecainide on the concentration dependence of the Spm-induced block suggested that it decreases the Spm block by a "noncompetitive" mechanism. Indeed, in the presence of flecainide, E<sub>max</sub> produced by Spm reached saturation at ≈82%. This finding suggests that flecainide does not compete with Spm for the same binding site at the channel level, but that interaction of flecainide to its own receptor site allosterically reduces the binding of polyamines. Previous studies demonstrated that the Glu224, Asp259, and Glu299 cytoplasmic residues help to maximize the rate of polyamine channel block (4, 15). Thus, we tested whether mutation of these residues decreased the outward I<sub>Kir2.1</sub> flecainide increase. The findings show that in E224A, D259A, and E299A nonrectifying channels, flecainide did not increase the I<sub>Kir2.1</sub>. It could be possible that flecainide interaction to the Cys311 at the βI strand modifies the position of the rings of negatively charged amino acids that create a complimentary electrostatic match for the binding of positively charged polyamines (4, 18). Therefore, this shows that a therapeutically used drug can affect Kir2.1 channels by modulating their interaction with polyamines.

Our findings strongly suggest that Cys311 located in the βI strand of the C terminus cytoplasmic domain of the Kir2.1 channel determines the flecainide binding. Furthermore, the presence of this Cys is critical for the increasing effects absent in Kir2.2 and Kir2.3 channels that do not exhibit a Cys residue at the equivalent position. The βI and βH strands form the HI loop or G loop (residues 300–315) (15). Mutations in the HI loop disrupted gating and affected inward rectification of Kir2.1 channels (15), and thus it seems reasonable to assume that binding of flecainide to this region can produce the observed effects. Moreover, the HI loop is structurally distinct from but functionally coupled to the PIP<sub>2</sub> binding site (13–15). Indeed, the adjacent residue to Cys311 within the βI strand (Arg312 in Kir2.1 channels) modulates the PIP<sub>2</sub>-channel interactions (14, 18). Furthermore, it has been previously shown that substitution of Cys311 by polar residues strongly modifies the Kir2.1 channel kinetic properties, producing long-lasting closed-time intervals that decreased the channel P<sub>o</sub>—effects that were attributed to a destabilization of PIP<sub>2</sub>-Kir2.1 interaction (13). Therefore, we surmised that flecainide interaction with Cys311 could increase the channel-activating PIP<sub>2</sub> effects. Our findings demonstrated that flecainide increased the P<sub>o</sub> of the channel by shifting the P<sub>o</sub>-V relationship to more negative potentials. Moreover, it did not modify the unitary current amplitude or the single-channel conductance, but augmented the mean open time and the f<sub>o</sub> of the channel. All

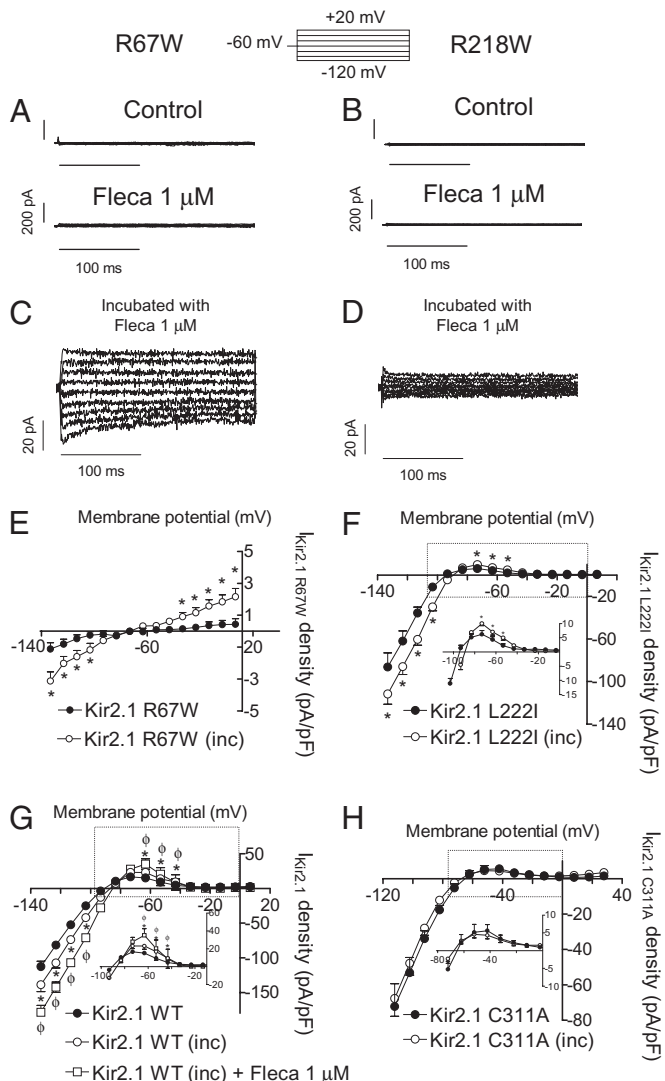


Fig. 6. Effects of flecainide on Kir2.1 channel density. Current traces recorded in a cell expressing R67W (A) and R218W (B) Kir2.1 in the absence and presence of flecainide. Current traces recorded in cells expressing R67W (C) and R218W (D) Kir2.1 channels incubated with flecainide for 24 h. The I-V curves for currents recorded in cells expressing R67W (E), L222I (F), WT (G), and C311A (H) Kir2.1 channels in control conditions and after incubation with flecainide. In G, squares represent acute effects of flecainide produced in cells incubated with flecainide. \*P < 0.01 vs. control. °P < 0.05 vs. incubated cells. Each point represents the mean ± SEM of eight experiments.

these effects resemble those produced by PIP<sub>2</sub> (14). Finally, the L222I mutation, which decreased Kir2.1 affinity for PIP<sub>2</sub>, suppressed the flecainide-increasing effects at potentials negative to the E<sub>K</sub>, leaving increasing effects at positive potentials unaltered. Overall, these findings suggest that flecainide also potentiates the activating PIP<sub>2</sub> actions on the channel, which contributes to its increasing effects—particularly at potentials negative to E<sub>K</sub>.

**Flecainide Increases Kir2.1 Channel Density.** Incubation for 24 h with flecainide increased functional Kir2.1 channel density. This effect was also dependent on the presence of Cys311 and, importantly, was additive to the acute flecainide-increasing effects. Therefore, flecainide would substantially increase homotetrameric Kir2.1 I<sub>K1</sub> by two mechanisms. To test whether flecainide increases the current and the functional density of AS-mutated channels, we tested its effects on R67W and R218W channels. As expected, acutely applied flecainide did not increase either R67W or R218W I<sub>Kir2.1</sub>, because both channels do not exhibit affinity for PIP<sub>2</sub>. However, incubation with flecainide for 24 h significantly increased R67W and L222I but not R218W I<sub>Kir2.1</sub> densities. Therefore, these preliminary findings suggest that in AS patients who carry mutations that produce functional channels, flecainide would increase I<sub>Kir2.1</sub> generated by WT and mutated channels by increasing their membrane density (i.e., flecainide would pharmacologically rescue some AS mutations).

Growing evidence suggests that ion-channel density can be modified pharmacologically. It has been described that two therapeutically used drugs that acutely block Kir2.1 also modify the expression of the channels in the membrane, i.e., incubation with chloroquine increases, and with pentamidine decreases, the I<sub>Kir2.1</sub> density of transfected cells (19). Further studies are needed to elucidate whether flecainide increases the anterograde delivery to or decreases the endocytosis of channel protein from the membrane.

**Therapeutic Implications.** Flecainide is a potent Na<sup>+</sup> channel blocker that also blocks several voltage-dependent K<sup>+</sup> channels (K<sub>v</sub>). Indeed, flecainide inhibits the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current (I<sub>to1</sub>) and the rapid component of the delayed rectifier current (I<sub>Kr</sub>) at concentrations close to those needed for blocking Na<sup>+</sup> channels (20, 21). Flecainide frequency-dependently increases the human atrial APD and refractoriness (6) without modifying human ventricular APD, as measured from the QT interval of the electrocardiogram (7). The selective increase of the ventricular I<sub>K1</sub> could account for this differential effect on atrial and ventricular APD. Indeed, because I<sub>K1</sub> plays a critical role in the final phase of repolarization, it could be speculated that the ventricular I<sub>K1</sub> increase overcomes the putative APD prolongation

produced by the simultaneous blockade of other K<sub>v</sub> channels. However, in the atrial tissue, in which flecainide did not increase the I<sub>K1</sub>, the APD prolongation produced by the blockade of K<sub>v</sub> channels will be apparent. Furthermore, the ventricular I<sub>K1</sub> increase could contribute to the ventricular proarrhythmic effects of flecainide. The importance of I<sub>K1</sub> in the establishment and maintenance of the stability of rotors and ventricular fibrillation dynamics has been demonstrated (5). The prediction is that an I<sub>K1</sub> increase accelerates and stabilizes the reentry (5).

Finally, it is noteworthy that the flecainide effects here described were produced at concentrations that are therapeutically relevant, because peak plasma concentrations after administration of therapeutic doses are between 0.4 and 2.2 μM (22).

## Conclusions

Overall, our findings show that Kir2.1 channels can be positively modulated through the decrease of their polyamine blockade by a therapeutically used drug. Moreover, flecainide increases the density of Kir2.1 channels, an effect that could produce the pharmacological rescue of functional AS-mutated channels. Both effects were based on the presence of a Cys residue at position 311 within the βI strand, which further stresses the role of the cytoplasmic domain and Cys residues of Kir2.x channels in controlling gating and rectification.

## Methods

This study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Gregorio Marañón (CNIC-13) and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Human atrial myocytes were enzymatically isolated from right atrial appendages obtained from patients that underwent cardiac surgery (Table S2) (12). Guinea-pig cardiomyocytes were also enzymatically isolated (23). Reverse transcription-PCR analysis of Kir2.x channels was developed with the primers depicted in Table S3. WT and mutated human Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 channels were transiently transfected in CHO cells (24). Macroscopic and single-channel currents were recorded using the whole-cell and cell-attached patch-clamp configurations, respectively. Inside-out recordings of I<sub>Kir2.1</sub> were developed in transiently transfected HEK-293 cells. All I–V curves were corrected according to the calculated liquid junction potential. Blind and manual dockings of flecainide on a modeled Kir2.1 channel were performed with AutoDock 4.0 and QUANTA/CHARMm software, respectively (23). Detailed *SI Methods* are available online.

**ACKNOWLEDGMENTS.** This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia Grant SAF2008-04903; Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III Grants Red HERACLES RD06/0009 and PI080665; Universidad Complutense de Madrid (4195); Fundación LILLY; and Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-13).

- Anumonwo JM, Lopatin AN (2010) Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 48:45–54.
- Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S (1998) Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* 98:2422–2428.
- Gaborit N, et al. (2007) Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 582:675–693.
- Lu Z (2004) Mechanism of rectification in inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Annu Rev Physiol* 66:103–129.
- Jalife J (2009) Inward rectifier potassium channels control rotor frequency in ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* 6(11, Suppl):S44–S48.
- Wang ZG, Pelletier LC, Talajic M, Nattel S (1990) Effects of flecainide and quinidine on human atrial action potentials. Role of rate-dependence and comparison with guinea pig, rabbit, and dog tissues. *Circulation* 82:274–283.
- Katritsis D, et al. (1995) Effect of flecainide on atrial and ventricular refractoriness and conduction in patients with normal left ventricle. Implications for possible antiarrhythmic and proarrhythmic mechanisms. *Eur Heart J* 16:1930–1935.
- Crijns HJ, et al. (1988) Acute conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm: Clinical efficacy of flecainide acetate. Comparison of two regimens. *Eur Heart J* 9:634–638.
- Pellizzón OA, Kalaizich L, Ptáček LJ, Tristani-Firouzi M, Gonzalez MD (2008) Flecainide suppresses bidirectional ventricular tachycardia and reverses tachycardia-induced cardiomyopathy in Andersen–Tawil syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 19:95–97.
- Bökenkamp R, Wilde AA, Schalij MJ, Blom NA (2007) Flecainide for recurrent malignant ventricular arrhythmias in two siblings with Andersen–Tawil syndrome. *Heart Rhythm* 4:508–511.
- Dhamoon AS, et al. (2004) Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 94:1332–1339.
- Liu GX, et al. (2001) Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 532:115–126.
- Garneau L, Klein H, Parent L, Sauvé R (2003) Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.1 inward rectifier. *Biophys J* 84:3717–3729.
- Logothetis DE, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A (2007) Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch* 455:83–95.
- Pegan S, et al. (2005) Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 8:279–287.
- Plaster NM, et al. (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 105:511–519.
- Lopes CM, et al. (2002) Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34:933–944.
- Bichet D, Haass FA, Jan LY (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* 4:957–967.
- de Boer TP, Houtman MJ, Compier M, van der Heyden MA (2010) The mammalian Kir2.x inward rectifier ion channel family: Expression pattern and pathophysiology. *Acta Physiol (Oxf)* 199:243–256.
- Wang Z, Fermi B, Nattel S (1995) Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 272:184–196.
- Follmer CH, Colatsky TJ (1990) Block of delayed rectifier potassium current IK by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes. *Circulation* 82:289–293.
- Slama R, LeClercq JF (1985) The clinical use of oral flecainide. *Drugs* 29(Suppl 4):28–29.
- Núñez L, et al. (2006) Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 72:80–89.
- Gómez R, et al. (2009) Nitric oxide increases cardiac I<sub>K1</sub> by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 105:383–392.

# Supporting Information

Caballero et al. 10.1073/pnas.10040211107

## SI Methods

**Human Atrial Myocyte Isolation.** This study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Gregorio Marañón (CNIC-13) and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent. Data regarding age, sex, type of surgery, and pharmacological treatment of the patients are provided in Table S2. Human right atrial specimens were obtained from patients ( $n = 3$ ) that underwent cardiac surgery. Atrial myocytes were enzymatically isolated following previously described methods (1, 2). In brief, samples were immediately placed into chilled  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution containing (in mM): NaCl 100, KCl 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  5, taurine 50, MOPS 5, and glucose 20 (pH 7.0 with NaOH) and supplemented with 2,3-butanedione monoxime (BDM, 30 mM), chopped into small pieces ( $\approx 1 \text{ mm}^3$ ), and washed  $3\times$  for 3 min with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution. Tissue pieces were then changed to  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution containing 254 U/mL collagenase type I (Worthington) and 0.5 mg/mL protease type XXIV (Sigma) and gently stirred for 15 min. Afterward, the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was raised to 0.2 mM, and the tissue was stirred for 30 min more. Stirring was continued with Tyrode's solution (0.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) containing only collagenase until rod-shaped striated myocytes were seen ( $\approx 35$  min). During all these steps, the solutions were continuously oxygenated with 100%  $\text{O}_2$  at 37 °C. Myocytes were kept until use in a storage solution containing (in mM): KCl 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10, glucose 10, K-glutamate 70,  $\beta$ -hydroxybutyrate 10, taurine 10, EGTA 10, and albumin 1 (pH 7.4 with KOH). Myocytes were used for electrophysiological recordings within 8 h.

**Guinea-Pig Atrial and Ventricular Myocyte Isolation.** Single ventricular myocytes were isolated from hearts of male guinea pigs (250–300 g) by enzymatic dissociation following a procedure previously described in detail (3, 4). Hearts were removed and rapidly mounted via the aorta on the cannula of a Langendorff perfusion system and initially perfused for 1–2 min with a modified Tyrode's solution containing 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ . The perfusate was oxygenated (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) and maintained at 37 °C. Then the hearts were perfused for 5 min at 10–15 mL/min with a  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution, followed by a 4-min perfusion with the same solution supplemented with 0.12 mg/mL collagenase type II (Worthington) and 0.03 mg/mL protease type XIV (Sigma). The hearts were then washed with a high- $\text{K}^+$  low- $\text{Cl}^-$  solution or “KB solution” for 4 min. Afterward, hearts were removed from the Langendorff apparatus, and atria and ventricles were dissected and cut in small pieces, which were placed in a beaker containing KB solution and gently shaken to disperse the cells. The resulting cell pellets were stored in KB medium for 1–2 h before beginning the experiments. The composition of the Tyrode's solution was as follows (in mM): NaCl 114, KCl 5.4,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgCl}_2$  1.0, taurine 20, glucose 10,  $\text{NaHCO}_3$  24, and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.42 (pH 7.4 with NaOH). The KB solution contained the following (in mM): glutamic acid 70, taurine 10, KCl 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10,  $\text{MgCl}_2$  1.0, succinic acid 5.0, creatine 5.7, glucose 10, EGTA 0.2, and Hepes 10 (pH 7.4 with KOH).

**Kir2.1 Constructs and Cell Transfection.** Human Kir2.1 WT and L222I cDNA were kindly provided by J. Jalife (University of Michigan, Ann Arbor, MI) and I. Levitan (Columbia University, New York), respectively. Human Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 were subcloned into pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen). C311A and C311S Kir2.1 mutants subcloned into pMT21 plasmid were kindly provided by R. Sauvé (University of Montreal, Montreal). E224A, D259A, E299A, R218W, and R67W Kir2.1, A312C Kir2.2, and A303C Kir2.3

mutations were made using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). All mutations were confirmed by direct DNA sequencing. CHO cells were cultured and transfected as previously described (1–8). Cells were grown in Ham-F12 medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin. The cultures were passaged every 4–5 d using a brief trypsin treatment. CHO cells were transiently transfected with the cDNA encoding WT or mutated Kir2.x channels (1.6  $\mu\text{g}$ ) together with the cDNA encoding the CD8 antigen (0.5  $\mu\text{g}$ ) by using FUGENE6 (Roche Diagnostics) following manufacturer instructions. For culture and transfections, 60-mm culture dishes were used. After 48 h, cells were incubated with polystyrene microbeads precoated with anti-CD8 antibody (Dynabeads M450; Dynal). Most of the cells that were beaded also had channel expression. The cells were removed from the dish with a cell scraper, and the cell suspension was stored at room temperature and used within 12 h for electrophysiological experiments.

**Recording Techniques. Macroscopic current recordings.** A small aliquot of cell suspension was placed in a 0.5-mL chamber mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon TMS, Nikon). After settling to the bottom of the chamber, cells were perfused at 1 mL/min with external solution (see composition below). Macroscopic currents were recorded at room temperature (21–23 °C) using the whole-cell patch-clamp technique using an Axopatch-200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices) (1–8). Recording pipettes were pulled from 1.0-mm OD borosilicate capillary tubes (GD1; Narishige) using a programmable patch micropipette puller (model P-2000 Brown-Flaming; Sutter Instruments) and heat-polished with a microforge (model MF-83; Narishige). Micropipette resistance was  $<3.5 \text{ M}\Omega$  when filled with the internal solution and immersed in the external solution. The capacitive transients elicited by symmetrical 10-mV steps from 0 mV were recorded at 50 kHz (filtered at 10 kHz) for subsequent calculation of capacitive surface area, access resistance, and input impedance. In all of the experiments, series resistance was compensated manually by using the series resistance compensation unit of the Axopatch amplifier, and  $\geq 80\%$  compensation was achieved. In CHO cells, uncompensated access resistance and cell capacitance were  $1.4 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ , and  $13.6 \pm 0.8 \text{ pF}$ , respectively ( $n = 34$ ), whereas mean maximum Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 current ( $I_{\text{Kir}2.1}$ ,  $I_{\text{Kir}2.2}$ , and  $I_{\text{Kir}2.3}$ ) amplitudes at  $-120 \text{ mV}$  were  $-2.2 \pm 0.2$  ( $n = 25$ ),  $-1.0 \pm 0.1$  ( $n = 4$ ), and  $-0.9 \pm 0.3 \text{ nA}$  ( $n = 5$ ), respectively. In human atrial myocytes, mean maximum  $I_{\text{K}1}$  amplitude at  $-100 \text{ mV}$ , uncompensated access resistance, and capacitance averaged  $-0.4 \pm 0.06 \text{ nA}$ ,  $2.9 \pm 0.6 \text{ M}\Omega$ , and  $84.6 \pm 17.8 \text{ pF}$  ( $n = 4$ ), respectively. In guinea-pig atrial and ventricular myocytes,  $I_{\text{K}1}$  amplitude at  $-120 \text{ mV}$ , uncompensated access resistance, and capacitance averaged  $-0.9 \pm 0.2$  and  $-1.8 \pm 0.2 \text{ nA}$ ,  $3.9 \pm 0.9$  and  $3.7 \pm 1.3 \text{ M}\Omega$ , and  $35.2 \pm 4.4$  and  $46.2 \pm 2.9 \text{ pF}$  ( $n = 4$  and  $5$ ), respectively. Thus, under our experimental conditions, no significant voltage errors ( $<5 \text{ mV}$ ) due to series resistance were expected with the micropipettes used. The current recordings were sampled at 4 kHz, filtered at half the sampling frequency, and stored on the hard disk of a computer for subsequent analysis. To record human atrial  $I_{\text{K}1}$ , the external solution contained (in mM): NaCl 120, KCl 20,  $\text{CaCl}_2$  1,  $\text{MgCl}_2$  1, Hepes 10, 4-aminopyridine 1, nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ), glucose 10, atropine (1  $\mu\text{M}$ ), and glibenclamide (10  $\mu\text{M}$ ) (pH 7.4 with NaOH). The liquid junction potential (LJP) between the pipette and external solution was  $-12.1 \text{ mV}$ . Guinea-pig myocytes were perfused with an external solution



containing (in mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, glucose 10, Hepes 10, 4-aminopyridine 1, nifedipine (1 μM), atropine (1 μM), and glibenclamide (10 μM) (pH 7.4 with NaOH). Under these conditions, the calculated LJP was -11.7 mV. In some experiments, the Ba<sup>2+</sup>-sensitive current was measured. In these experiments, guinea-pig myocytes were first perfused with control external solution followed by external solution containing 1 μM flecainide (Sigma), and finally with external solution containing flecainide and BaCl<sub>2</sub> (100 μM). Ba<sup>2+</sup>-sensitive currents were obtained by digital subtraction of current traces. Recording pipettes were filled with an internal solution containing (in mM): K-aspartate 80, KCl 42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, MgATP 5, phosphocreatine 3, Hepes 5, and EGTA 5 (pH 7.2 with KOH). To record I<sub>Kir2.1</sub>, I<sub>Kir2.2</sub>, and I<sub>Kir2.3</sub>, CHO cells were perfused with an external solution containing (in mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, Hepes 10, and glucose 10 (pH 7.4 with NaOH; LJP = -13.2 mV). Under these conditions, current amplitudes were stable during the time of recordings (Fig. S1). C311A I<sub>Kir2.1</sub> and C311S I<sub>Kir2.1</sub> were recorded at 20 mM extracellular K<sup>+</sup> concentration ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>), the calculated LJP being -12.1 mV. To obtain 20- and 140-mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> solutions, equimolar substitution between KCl and NaCl was used. The internal solution used for whole-cell current recordings in CHO cells was the same as described for recording native I<sub>K1</sub> (see above). All of the current-voltage (I-V) curves were corrected according to the calculated LJP (2, 9).

**Single-channel recordings.** Single-channel currents were recorded at room temperature using the cell-attached patch-clamp configuration (Axopatch-200B patch-clamp amplifier) (2). Cells were suspended in bath solution (in mM) [KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, Hepes 10, and glucose 10 (pH 7.4 with KOH)]. Patch pipettes were pulled from 1.5-mm OD borosilicate capillary tubes (Harvard Apparatus), coated at the tip with Sylgard (Dow Corning), and fire-polished with a microforge. When filled with pipette solution (in mM) [KCl 140 and Hepes 10 (pH 7.4 with KOH)], tip resistances were between 5 and 10 MΩ. Patches with more than one channel were discarded.

**Inside-out recordings.** In some experiments, currents were recorded at room temperature from excised inside-out macropatches from HEK-293 cells using an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (10, 11). Recordings were made by using a fluoride, vanadate, and pyrophosphate (FVPP)-potassium solution on both sides of the patch containing (in mM): KCl 123, K<sub>2</sub>EDTA 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.1, KF 5, K<sub>4</sub>HP<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 (pH 7.2 with KOH) to prevent current rundown (10, 11). This solution was Mg<sup>2+</sup>- and spermine-free. A solution adjusted to pH 5.0 was used to abolish any detectable currents through Kir channels, and offline subtraction of the currents recorded when perfusing with the solution at pH = 5 was used to subtract endogenous currents. Patch pipettes were pulled from 1.5-mm OD borosilicate capillary tubes (World Precision Instruments). When filled with FPVV solution, tip resistances were between 1.0 and 1.5 MΩ. These experiments were conducted in a chamber that allowed the solution bathing the exposed surface of the isolated patch to be changed rapidly (Fast-Step SF-77B perfusion system; Warner Instruments).

**Pulse Protocols and Analysis.** The protocol to record human atrial I<sub>K1</sub> consisted of 50-ms steps from -80 mV to -100 mV followed by depolarizing ramps to -10 mV (800 ms) (2). To record guinea-pig atrial and ventricular I<sub>K1</sub>, 250-ms pulses from a holding potential of -40 mV to potentials ranging from -120 to -40 mV were applied (12). For macroscopic I<sub>Kir2.1</sub> recorded in the presence of 4 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>, the protocol to obtain I-V curves consisted of 250-ms pulses in 10-mV increments from -60 mV to potentials between -120 and +20 mV (2). At 140 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>, I<sub>Kir2.1</sub> was recorded by applying 250 ms-pulses from +10 mV to potentials ranging -60 and +90 mV. In some experiments, I<sub>Kir2.1</sub> was recorded in CHO cells by using an action potential recorded

in an isolated dog epicardial ventricular myocyte as the command signal. The protocol to obtain I<sub>Kir2.2</sub> and I<sub>Kir2.3</sub> I-V curves consisted of 250-ms pulses in 10-mV increments from -60 mV to potentials between -120 and +20 mV. The current amplitude was measured at the end of the pulse.

To obtain the EC<sub>50</sub> (concentration that produces the half maximum response), the IC<sub>50</sub> (concentration that produces the half maximum inhibition), and the Hill coefficient (*n*<sub>H</sub>), the increase produced by flecainide and the blockade produced by spermine at various concentrations [D] were fitted to the equation:

$$f = E_{min} + (E_{max} - E_{min}) / \left\{ 1 + (EC_{50}/[D])^{n_H} \right\}.$$

The degree of rectification for Kir2.1 channels was estimated from the relative chord conductance (*G<sub>c</sub>*), i.e., the conductance relative to that expected for a nonrectifying current (13). *G<sub>c</sub>* was calculated as the ratio of the actual current and current predicted by assuming a linear unblocked current (data for *G<sub>c</sub>* near the reversal potential were discarded from analysis because the current ratio approaches "0/0" at voltage near this potential). *G<sub>c</sub>* relationships in control conditions and in the presence of flecainide were fitted by a single Boltzmann equation:

$$y = [1 / \{1 + \exp(-\lambda(V - V_h))\}],$$

where *V* is the membrane potential, *V<sub>h</sub>* represents the midpoint of the curve, and  $\lambda = zF/RT$ , where *z* stands for the effective valency or steepness of rectification, *F* is Faraday's constant, *R* is the gas constant, and *T* is the absolute temperature.

Single-channel currents were recorded by applying 10-s pulses from a holding potential of 0 mV to potentials between -110 and -20 mV (2), amplified, digitized at 10 kHz, and stored on the hard disk of a computer for subsequent analysis. The recordings were filtered at 1 kHz. Data were analyzed using pCLAMP software. Open probability (*P<sub>o</sub>*) was calculated in each experiment by dividing the time that the channel remains in the open state by the total recording time. In some experiments, *P<sub>o</sub>* values at each potential (*P<sub>o</sub>*-*V* curves) were obtained, and a Boltzmann function was fitted to the data:

$$P_o = (P_{o_{min}} - P_{o_{max}}) / [1 + \exp(V - V_h) / k] + P_{o_{max}},$$

where *P<sub>o\_{min}}</sub>* and *P<sub>o\_{max}</sub>* represent the minimum and maximum *P<sub>o</sub>*, *V* is the membrane potential, *V<sub>h</sub>* is the membrane potential at which *P<sub>o</sub>* reaches its half-maximum value, and *k* is the slope factor.

The opening frequency (*f<sub>o</sub>*) was calculated for each experiment as the inverse of the closed time between events. Amplitude of unitary currents in control conditions and in the presence of 1 μM flecainide were calculated for each experiment from a Gaussian distribution fit to amplitude histograms that were constructed by plotting amplitude data as a function of the number of events per bin (bin width = 0.05 pA). To calculate the slope conductance, the single-channel current amplitude was plotted as a function of the membrane potential, and a linear function was fitted to the data. Mean open-time was calculated by dividing the total time that the channel remains in the open state by the total number of openings.

Inside-out recordings were performed by applying 500-ms pulses from a holding potential of -70 mV to +70 mV, followed by a second 500-ms pulse to -80 mV. Currents were digitized at 2 kHz and stored on the hard disk of a computer for subsequent analysis by using pCLAMP software. The recordings were filtered at 1 kHz. Spermine-induced block was measured as the reduction of the total charge crossing the membrane (calculated as current-time integrals at +70 mV).

**Molecular Modeling and Ligand Docking.** Molecular modeling was performed to obtain the lowest energy-minimized blind docking for flecainide with a full-length channel composed of the crystal structure of one cytoplasmic domain of Kir2.1 (PDB ID code 1U4F)

and a modeled transmembrane domain based on KirBac1.1 crystal structure (PDB ID code 1P7B). Kir2.2 and Kir2.3 cytoplasmic domains were modeled using an alignment between this region of Kir2.1 and the corresponding region of Kir2.2 and Kir2.3 channels. The structural model of flecainide was retrieved from DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>), and its ionization was adjusted for a  $pK_a$  of 9.3. The blind docking was performed with the AutoDock 4.0 program using the Lamarckian genetic algorithm. When there is no prior knowledge of the binding site for small molecules on a target protein, a blind-docking study is a useful method to identify some possible complexes based on an evaluation of binding-free energies ( $\Delta G$ s). The efficiency of a blind-docking study using the AutoDock program has been shown in previous reports (14, 15). The graphical user interface program "Autodock Tools" was used to prepare, run, and analyze the docking simulations. Default parameters were used, except for the number of generations, energy evaluations, and docking runs, which were set to 1,000, 2.5 million, and 100, respectively. Affinity grid fields were generated using the auxiliary program AutoGrid. Docking was performed in a  $65 \times 65 \times 65$  Å volume centered at the middle of the channel protein, with grid spacing of 0.375 Å. The modeled channels were held rigid, and all of the torsional bonds of flecainide were taken as being free during docking calculations. Based on the RMSD cluster tolerance (2 Å), the complexes between the modeled channel and flecainide molecules were sorted into clusters, i.e., a mass of unless two conformations having RMSD less than 2 Å. The cluster ranks based on  $\Delta G$ s, and the number of conformations during 100 runs are summarized in Table S1. The cluster with the lowest  $\Delta G$  was selected, and flecainide was manually docked into the cytoplasmic domain by using QUANTA/CHARMm software (Accelrys). Energy minimization was performed to eliminate close contacts. Flecainide was assembled within QUANTA using standard bond lengths and angles. Mechanics energy minimization was done using the CHARMm force field. The Kir2.1 channel-flecainide complexes obtained were minimized with a Newton Raphson method, considering the structures as fully optimized when the energy changes between two successive iterations were less than 0.01 kcal/mol (1 kcal = 4.18 kJ) (16).

A blind docking for flecainide with the cytoplasmic domain formed by the four Kir2.1 subunits (PDB ID code 1U4F) was also performed. Default parameters were used, except for the number of generations, energy evaluations, and docking runs, which were set to 27,000, 2.5 million, and 150, respectively. Docking was performed in a  $47 \times 65 \times 65$  Å volume centered at the middle of the channel protein, with grid spacing of 0.531 Å.

**Drugs.** Flecainide (Sigma) was initially dissolved in methanol to yield 10-mM stock solutions. Drug solutions were prepared freshly for each experiment. Glibenclamide, atropine, nifedipine, and spermine were purchased from Sigma as a powder and dissolved as appropriate to yield 0.01-M stock solutions. Further dilutions were carried out in external solution to obtain the desired final concentration. Control solutions always contained the same solvent concentrations as the test solution. In some experiments, CHO cells expressing WT, C311A, L222I, R218W, R67W Kir2.1, as well as WT or A312C Kir2.2 and WT or A303C Kir2.3 channels were cultured (as described previously) in the presence of 1  $\mu$ M flecainide for 24 h. The final concentration of flecainide was made by adding the stock solution to the culture medium. Simultaneously, another batch of transfected cells was cultured in the presence of the same methanol concentration as in the flecainide-incubated cells. Drug or solvent were removed by culturing cells for 1 h in drug-free medium at 37 °C before electrophysiological recordings.

**Analysis of the mRNA Expression of Kir2.x Channels (17).** *Tissue and RNA preparation.* Total RNA was isolated from guinea-pig atrial and ventricular samples ( $n = 6$ ). Immediately after the excision, tissue

samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C until further processing. Total RNA was purified from the homogenized tissue samples (homogenizer Ultra Turrax T18 IKA) with RNeasy midi kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified by photometry ( $\lambda = 260$  nm), and the purity of the samples was verified by the 260/280 ratio by Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific).

**Reverse transcription-PCR analyses.** Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed using the One-Step RT-PCR Kit (Qiagen). Target gene-specific oligonucleotide primer pairs (forward and reverse) were designed for guinea-pig Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene sequences obtained from GenBank DNA sequences database (Table S3). Primers were synthesized by Roche Diagnostics via TIB-MOLBIOL and supplied in lyophilised form. The melting temperature ( $T_m$ ) for each primer target gene used in the PCR reactions is indicated in Table S3. RT-PCR was performed on 0.25  $\mu$ g of total RNA, and the reactions were repeated at least 3 $\times$  for each sample. RT-PCR was performed using the thermocycler Mastercycler Pro (Eppendorf) using the following thermal cycle conditions: one step for reverse transcription (50 °C 30 min) and initial PCR activation step (95 °C 15 min). Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 amplification involved 35 cycles of 1 min of DNA denaturalization at 94 °C, 1 min of primer annealing (at optimized annealing temperature; Table S3), and 1.5 min of primer elongation at 72 °C. The final extension step was performed for 10 min at 72 °C. The amplification products were run on 1.8% agarose gel containing ethidium bromide (0.5 ng/mL) and visualized under UV light. Molecular-weight markers (Sigma) were added to one lane to estimate the size of the amplification products. The housekeeping gene GAPDH was used as internal standard. None of the Kir2.x channel-specific primers cross-reacted with the GAPDH primer after 35 cycles of PCR.

**Statistical Methods.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Paired or unpaired  $t$  test or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. To make comparisons between two different concentration-response curves, an  $F$  test was used. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## SI Results

**Time- and Concentration-Dependent Effects of Flecainide on Kir2.1 Channels.** As seen in Fig. S1, amplitude of  $I_{Kir2.1}$  recorded at  $-120$  mV (Fig. S1A) and  $-50$  mV (Fig. S1B) was stable during control recordings. Afterward, when the perfusion with the flecainide-containing solution was initiated, steady-state effects were reached after  $\approx 3$  min. Finally, the  $I_{Kir2.1}$  increase produced by flecainide was completely reversible after 2–3 min of perfusion with drug-free solution. In Fig. S1 C and D, the  $I_{Kir2.1}$  increase measured at the end of pulses to  $-120$  and  $-50$  mV, respectively, was represented as a function of the flecainide concentration. The Hill equation was used to fit the concentration dependence of the increase, and the concentration that produces the half-maximum effect ( $EC_{50}$ ) and the maximum effect ( $E_{max}$ ) obtained at  $-120$  mV were  $0.8 \pm 0.01$   $\mu$ M ( $n_H = 1.6 \pm 0.4$ ) and  $22 \pm 1.9\%$ , respectively (Fig. S1C). At  $-50$  mV, the  $EC_{50}$  and the  $E_{max}$  averaged  $0.4 \pm 0.01$   $\mu$ M ( $n_H = 2.2 \pm 0.2$ ) and  $53.9 \pm 3.6\%$ , respectively (Fig. S1D). This finding showed that flecainide preferentially increased the outward  $I_{Kir2.1}$  generated at physiological potentials.

**Flecainide Increases  $I_{Kir2.1}$  Recorded by Applying an AP Voltage-Clamp Protocol.** To determine the effect of flecainide in a physiologically relevant setting, we used an epicardial AP voltage-clamp protocol (Fig. S2). In control conditions,  $I_{Kir2.1}$  was small during the plateau phase of the AP, rapidly increased during the terminal phase of the repolarization, and declined in early diastole. Flecainide induced the appearance of a peak coinciding with the notch of the AP and

increased the peak outward current at the end of the repolarization in a concentration-dependent manner (Fig. S24). As a consequence, flecainide increased the charge crossing the membrane estimated from the integral of the current traces reaching a  $137 \pm 28\%$  at a concentration of  $1 \mu\text{M}$  (Fig. S2B).

**Flecainide Does Not Modify Kir2.2 and Kir2.3 Currents.** Because Kir2.2 and Kir2.3 proteins also contribute to cardiac  $I_{K1}$ , the effects of flecainide on these channels were studied (Fig. S3). In both cases, under control conditions, hyperpolarizing pulses elicited large inward currents, whereas depolarizing pulses elicited small outward currents, with inward  $I_{\text{Kir}2.3}$  activation kinetics being slower than those of  $I_{\text{Kir}2.1}$  and  $I_{\text{Kir}2.2}$  (Fig. S4). Flecainide failed to modify  $I_{\text{Kir}2.2}$  and  $I_{\text{Kir}2.3}$  at potentials both negative and positive to  $E_K$  ( $P > 0.05$  vs. control,  $n = 10$ ; Fig. S3 A–D).

**Effects of Flecainide on Heterotetrameric Kir2.x Channels.** To determine flecainide actions on heterotetramers of Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 subunits, we studied the effects of flecainide on cells cotransfected (ratio 1:1) with both Kir2.1 and Kir2.2 (Kir2.1/Kir2.2) and with Kir2.1 and Kir2.3 (Kir2.1/Kir2.3; Fig. S4). The time course of Kir2.1 activation was slower than that of Kir2.2 but much faster than that of Kir2.3 channels. Kir2.1/Kir2.2 and Kir2.1/Kir2.3 currents displayed activation kinetics significantly different from those of the homotetrameric channels, demonstrating the heterotetrameric nature of the channels. Under these conditions, flecainide failed to increase inward and outward current ( $P > 0.05$  vs. control,  $n \geq 4$ ), suggesting that the increasing effects are only apparent in channels composed of four Kir2.1 subunits.

**Effects of Flecainide on L222I Kir2.1 Channels.** To determine whether flecainide effects could be due to an increase of the activating effects on the channel induced by  $\text{PIP}_2$ , we tested the effects of flecainide on L222I Kir2.1 channels, a mutation that decreases the channel affinity for  $\text{PIP}_2$  but that renders functional channels (18) (Fig. S5). As can be observed, current density of L222I ( $-74.2 \pm 14.9$  pA/pF at  $-120$  mV) is significantly lower than that of WT channels ( $-115.5 \pm 15.2$  pA/pF; Fig. S5A), in accordance with previous reports indicating that strong channel- $\text{PIP}_2$  interactions produce larger currents than do weak interactions (18). Moreover, it is shown that the decrease of the channel affinity for  $\text{PIP}_2$  suppressed the flecainide  $I_{\text{Kir}2.1}$ , increasing effects at potentials negative to the  $E_K$ , while increasing effects at positive potentials were still apparent ( $37.4 \pm 4.5\%$  of increase at  $-50$  mV, compared with the  $45.8 \pm 9.8\%$  increase in WT channels,  $P < 0.05$ ; Fig. S5B). Overall, these findings suggest that flecainide also potentiates the activating  $\text{PIP}_2$  effects on the channel, an effect that contributes to its increasing effects, particularly at potentials negative to the  $E_K$ .

**Flecainide Binds to the C Terminus Cytoplasmic Domain of Kir2.1 Channels.** To explore the putative binding site of flecainide within Kir2.1 channels, a molecular model was developed. A blind docking for flecainide with a full-length channel composed of the crystal structure of one cytoplasmic domain of Kir2.1 (19) and a modeled transmembrane domain based on KirBac1.1 crystal structure was performed. As a result of a study involving 100 runs, 40 flecainide conformations were obtained (Fig. S64). Twenty of 40 conformations (yellow) are located on the  $\beta\text{I}$  strand within the Kir2.1 cytoplasmic domain (Fig. S64). These 20 conformations were clustered (RMSD  $< 2$  Å), and six clusters were obtained (Table S1). Interestingly, the conformations with the lowest energy (corresponding to clusters 1 and 2) were very close ( $< 3$  Å) to Cys311.

A blind-docking study of flecainide within the cytoplasmic domain of Kir2.2 (Fig. S74) and Kir2.3 (Fig. S7B) channels was per-

formed. The analysis of the most favorable conformations resulting from a study involving 100 runs showed that none of these conformations corresponded to the most favorable poses in Kir2.1 (Fig. S7).

In the cytoplasmic domain, N and C terminus of adjacent Kir2.1 subunits interact to form a complex structure (19). Thus, a blind docking for flecainide on the cytoplasmic domain formed by the four subunits was also developed. The findings showed that flecainide did not bind to the interface of neighboring subunits. In this case, the results predicted interactions of flecainide with the  $\beta\text{I}$  strand and the cytoplasmic pore. However, the presence of flecainide into the pore did not seem compatible with an increase of the  $\text{K}^+$  flux through it. Therefore, these findings were discarded.

The flecainide conformations with the lowest binding-free energy ( $\Delta G$ ; Table S1), located on the  $\beta\text{I}$  strand, were defined as the most practical binding site on Kir2.1 channels, and then the drug was manually docked into it (Fig. S6 B and C). In the lowest-energy pose ( $-11.3$  kcal/mol), flecainide was predicted to bind strongly to Cys311 by forming three hydrogen bridge bonds (one between the carbonyl oxygen atom of flecainide and the thiol group of the Cys residue, and two between the carbonyl oxygen atom of the amino acid and the nitrogen atoms of the amide and of the piperidine groups of flecainide; Fig. S6B). Moreover, flecainide would establish single hydrogen-bridge bonds with Val296, Ile297, and Ser313 residues (Fig. S6B and C). This region is highly conserved among Kir2.x channels, Cys311 being the only different residue between Kir2.1 and Kir2.2 and Kir2.3 (Fig. S6D). Thus, we surmised that Cys311 can determine the selective flecainide binding to Kir2.1 channels.

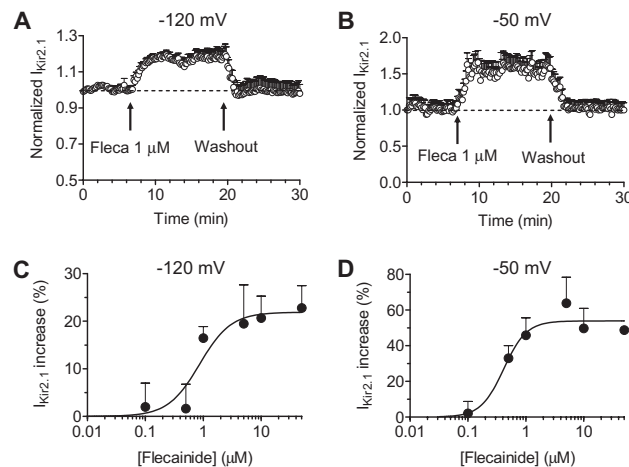
**Electrophysiological Characterization of R67W and R218W Kir2.1 Channels.** To evaluate whether R67W and R218W channels are functionally present in the plasma membrane, currents generated by these channels were recorded at  $[\text{K}^+]_o = 140$  mM. Both in cells incubated with flecainide and those that were not, the current generated by R67W channels markedly increased when increasing the  $[\text{K}^+]_o$  to 140 mM, suggesting that the channels present in the plasma membrane were functional (Fig. S8 A and C). It is interesting to note that the amplitude of the currents recorded in cells incubated with the drug were significantly larger than those recorded in nonincubated cells ( $-20.8 \pm 12.4$  vs.  $-57.8 \pm 15.7$  pA/pF at  $-60$  mV,  $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ; Fig. S8C). Conversely, R218W channels did not generate measurable currents at  $[\text{K}^+]_o = 140$  mM (Fig. S8B;  $n = 8$ ), suggesting that R218W channels were non-functional even when it has been described that they are able to reach the cell membrane (20). However, the fact that the current recorded in R67W transfected cells incubated with flecainide for 24 h was completely inhibited by  $\text{BaCl}_2$ , strongly suggested that the current is carried by Kir2.1 channels (Fig. S8 D and E).

**Effects of the Incubation with Flecainide on Kir2.x Channels Depends on the Presence of Cys311.** To further confirm that the presence of Cys311 is also critical for the increasing effect induced by 24-h incubation with flecainide, we tested the effects of the incubation of cells transfected with homotetrameric WT Kir2.2 and Kir2.3, heterotetrameric Kir2.1/Kir2.2 and Kir2.1/Kir2.3, as well as in A312C Kir2.2 and A303C Kir2.3 channels (Fig. S9). As can be observed, incubation with flecainide does not significantly modify the current density of homotetrameric Kir2.2 and Kir2.3 and heterotetrameric Kir2.1/Kir2.2 and Kir2.1/Kir2.3 channels, but increases current density of A312C Kir2.2 and A303C Kir2.3 channels. These findings show that the flecainide effect on Kir2.1 current density is only apparent in homotetrameric Kir2.1 channels, and that the presence of a Cys residue at position 311 is also critical for it.

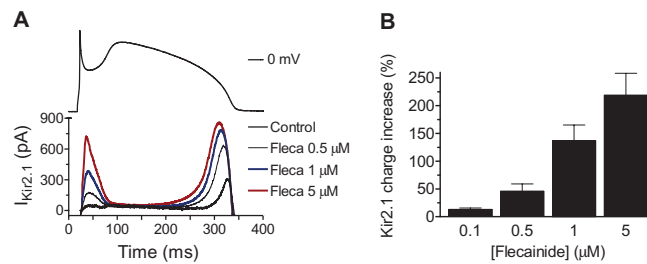
1. Gómez R, et al. (2008) Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current ( $I_{to1}$ ). *Cardiovasc Res* 80:375–384.

2. Gómez R, et al. (2009) Nitric oxide increases cardiac  $I_{K1}$  by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 105:383–392.

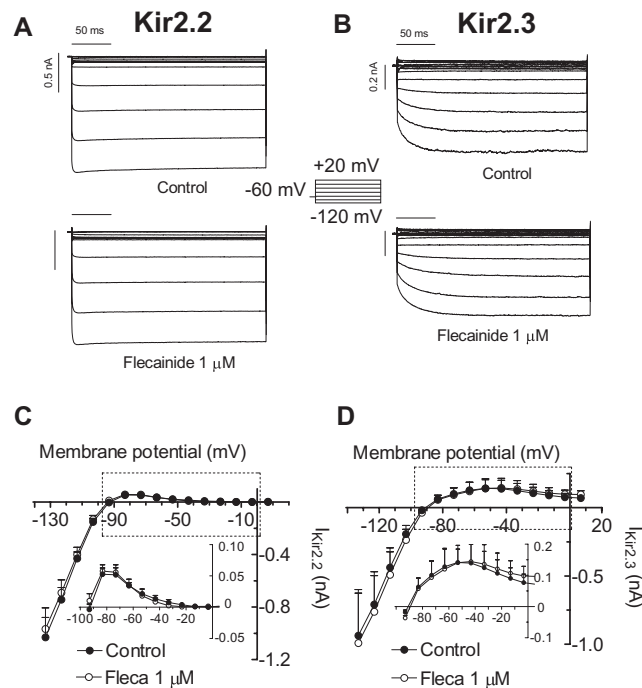
3. Caballero R, et al. (2003) Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 107:889–895.
4. Gómez R, et al. (2005) Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1 + minK channels. *Br J Pharmacol* 146:146–161.
5. Delpón E, et al. (2008) Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1:209–218.
6. Radicke S, et al. (2008) Effects of MiRP1 and DPP6 beta-subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 154:774–786.
7. Amorós I, et al. (2010) Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol* 48:201–210.
8. Barana A, et al. (2010) Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res* 85:56–67.
9. Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123–131.
10. Ponce-Balbuena D, et al. (2009) Tamoxifen inhibits inward rectifier Kir2.x family of inward rectifier channels by interfering with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-channel interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 331:563–573.
11. Rodríguez-Menchaca AA, et al. (2008) The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1364–1368.
12. Yan DH, et al. (2005) Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K<sup>(+)</sup> currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* 563:713–724.
13. Shyng SL, Sha Q, Ferrigni T, Lopatin AN, Nichols CG (1996) Depletion of intracellular polyamines relieves inward rectification of potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12014–12019.
14. Hetényi C, van der Spoel D (2002) Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Sci* 11:1729–1737.
15. Sunaga S, Yoshimori A, Shiokawa D, Tanuma S (2006) Structure basis for the inhibitory mechanism of a novel DNase gamma-specific inhibitor, DR396. *Bioorg Med Chem* 14:4217–4226.
16. Núñez L, et al. (2006) Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 72:80–89.
17. Caballero R, et al. (2010) In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 55:2346–2354.
18. Logothetis DE, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A (2007) Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K<sup>(+)</sup> channels. *Pflügers Arch* 455:83–95.
19. Pegan S, et al. (2005) Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 8:279–287.
20. Plaster NM, et al. (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 105:511–519.



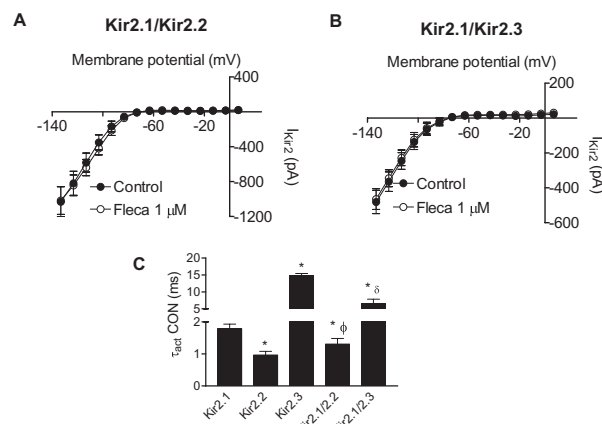
**Fig. S1.** Time- and concentration-dependent effects of flecainide on Kir2.1 channels. Open circles represent normalized  $I_{Kir2.1}$  recorded at -120 mV (A) and at -50 mV (B) during control recordings, after beginning the flecainide (1  $\mu$ M) perfusion and, finally, following the washout of the drug with drug-free solution. The arrows represent the beginning and the end of perfusion with flecainide-containing solution. Percentage of  $I_{Kir2.1}$  increase at -120 mV (C) and at -50 mV (D) as a function of flecainide concentrations. Continuous lines represent the fit of a Hill equation to the data. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of four or more experiments.



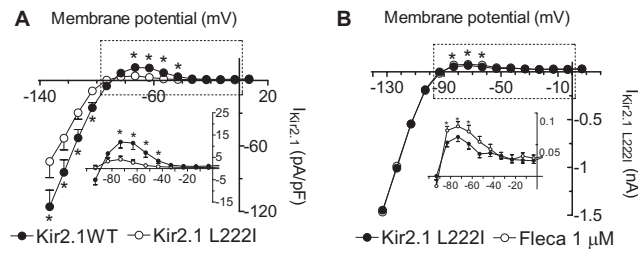
**Fig. S2.** Flecainide increases  $I_{Kir2.1}$  recorded by applying an AP voltage-clamp protocol. (A)  $I_{Kir2.1}$  traces elicited by AP command signals (Top) as voltage protocol under control conditions and in the presence of increasing concentrations of flecainide. (B) Bar graph showing the percentage of flecainide-induced increase of the charge crossing the membrane through Kir2.1 channels as a function of the concentration. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of at least four experiments with each flecainide concentration.



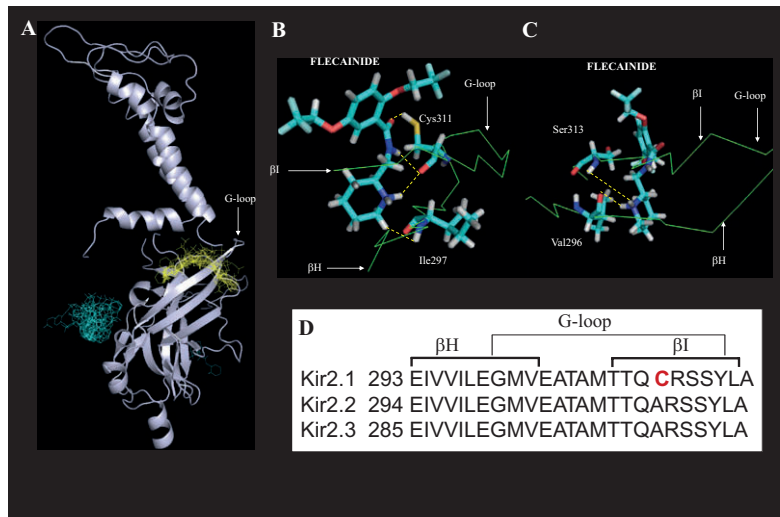
**Fig. S3.** Flecainide does not modify  $I_{Kir2.2}$  and  $I_{Kir2.3}$ .  $I_{Kir2.2}$  (A) and  $I_{Kir2.3}$  (B) traces recorded by applying the protocol shown in the absence and presence of flecainide. I-V curves for  $I_{Kir2.2}$  (C) and  $I_{Kir2.3}$  (D). (Insets) Data at potentials positive to  $E_K$  in an expanded scale. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of at least four experiments.



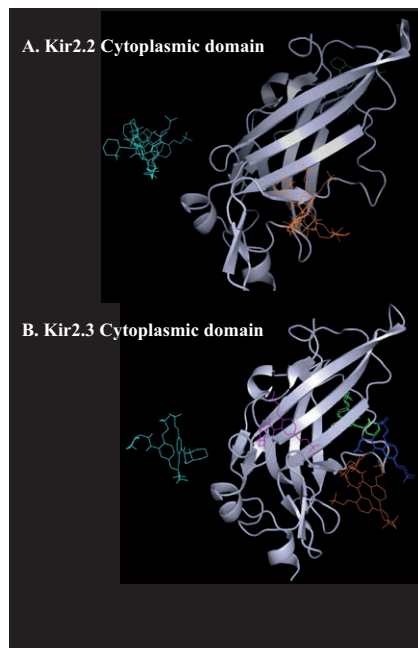
**Fig. S4.** Effects of flecainide on heterotetrameric Kir2.x channels. Mean I-V curves for currents recorded on cells cotransfected (ratio 1:1) with both Kir2.1 and Kir2.2 (Kir2.1/Kir2.2) (A) and with Kir2.1 and Kir2.3 (Kir2.1/Kir2.3) (B) in the absence and presence of 1  $\mu$ M flecainide. (C) Bar graph showing the time constant of activation at  $-120$  mV obtained by fitting a monoexponential function to the current traces. In the I-V relationships, the voltage was adjusted to the liquid junction potential of  $-13.2$  mV.



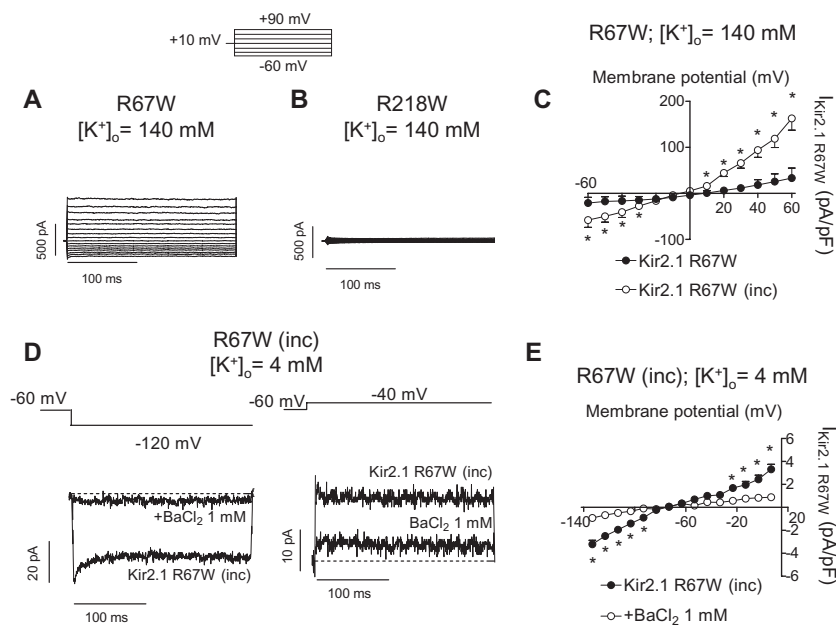
**Fig. S5.** Effects of flecainide on L222I Kir2.1 channels. (A) Mean current density curves for currents recorded in CHO cells transfected with WT or L222I Kir2.1 channels. \* $P < 0.05$  vs. WT. (B) Mean I-V curves for currents recorded in CHO cells expressing L222I Kir2.1 channels in the absence and presence of 1  $\mu$ M flecainide. \* $P < 0.05$  vs. control. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of five experiments.



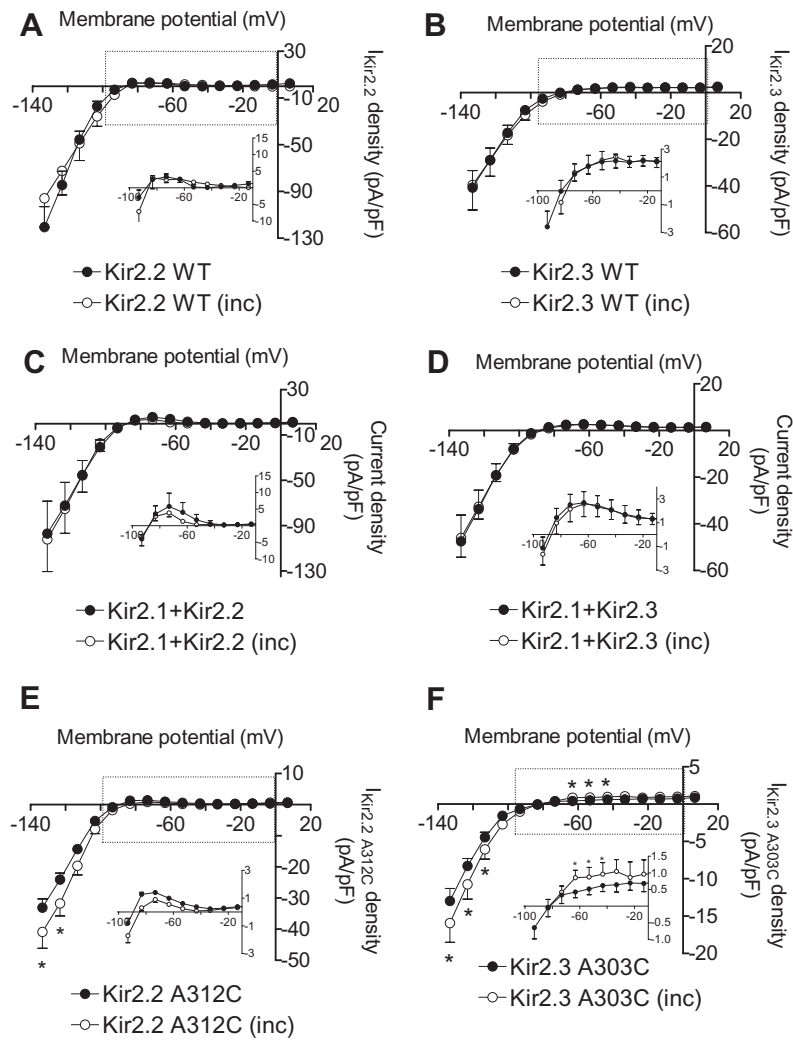
**Fig. S6.** Molecular model of flecainide within Kir2.1 channels. (A) Results of the blind-docking study of flecainide within the full Kir2.1 channel. (B and C) Predicted bonds between flecainide and the amino acids located in the binding site within the cytoplasmic domain. (D) Amino acid sequence alignments of the  $\beta$ H- $\beta$ I region of Kir2.1–3 channels.



**Fig. S7.** Blind docking of flecainide on Kir2.2 and Kir2.3 channels. Results of the blind-docking study of flecainide within the cytoplasmic domain of Kir2.2 (A) and Kir2.3 (B) channels. The structure of Kir2.2 and Kir2.3 cytoplasmic domains were constructed by using the crystallized Kir2.1 cytoplasmic domain retrieved from the Protein Data Bank (PDB ID code 1U4F) as a template. Only the most favorable conformations resulting from a study involving 100 runs are depicted in the figure.



**Fig. S8.** Electrophysiological characterization of R67W and R218W Kir2.1 channels. Current traces recorded at  $[K^+]_o = 140$  mM by applying 250 ms pulses from +10 mV to potentials ranging from -60 to +90 mV in CHO cells expressing R67W (A) or R218W (B) under control conditions. (C) Mean current density curves for currents recorded in CHO cells expressing R67W Kir2.1 channels incubated or not with 1  $\mu$ M flecainide for 24 h.  $*P < 0.05$  vs. data from nonincubated cells. (D) Current traces recorded at -120 mV (Left) or at -40 mV (Right) in a CHO cell expressing R67W Kir2.1 channels incubated with flecainide (1  $\mu$ M) for 24 h ( $[K^+]_o = 4$  mM) in control conditions and after perfusion with an external solution containing BaCl<sub>2</sub> (1 mM). (E) Mean current density curves for currents recorded in cells expressing R67W Kir2.1 channels after incubation with flecainide in the absence and presence of BaCl<sub>2</sub>.  $*P < 0.01$  vs. data in the presence of BaCl<sub>2</sub>. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of five experiments in each group.



**Fig. 59.** Effects of the incubation with flecainide on Kir2.x channels depends on the presence of Cys311. Mean I-V curves for currents recorded in CHO cells transfected with Kir2.2 WT (A), Kir2.3 WT (B), Kir2.1 + Kir2.2 (C), Kir2.1 + Kir2.3 (D), A312C Kir2.2 (E), and A303C Kir2.3 (F) channels incubated or not with 1  $\mu$ M flecainide for 24 h. \* $P < 0.05$  vs. currents recorded in CHO cells not incubated with flecainide. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of eight or more experiments in each group.



**Table S1. Results of the blind-docking study of flecainide on Kir2.1 channels**

Cluster rank	$\Delta G$ , kcal/mol	No. of conformations in cluster
1	-7.460	3
2	-7.515	2
3	-6.935	2
4	-6.885	2
5	-6.430	3
6	-6.295	2

**Table S2. Patient characteristics (mean age  $75 \pm 3$  y)**

Characteristics	No./total
Female	1/3
Surgery	
Valve surgery	2/3
CABG surgery	3/3
Treatment	
Beta blockers	1/3
ACE inhibitors/angiotensin receptor blockers	3/3
Statins	2/3
Acetylsalicylic acid	2/3

ACE, angiotensin converting enzyme; CABG, coronary artery bypass grafting.

**Table S3. Sequence of primers used in study**

Protein	Primers	$T_{m}$ , °C	Optimal annealing temperature, °C
Kir2.1	F 5'-CCTCCATTCCACTGCGTGTGCC-3'	69.3	69.9
	R 5'-GCCAACTTCATGCCGTCCTTCC-3'	66.8	
Kir2.2	F 5'-GCCACTGACCAAGGATCTGCGGGTG-3'	71.2	69.9
	R 5'-GCACCCGACATGGTGACCAAGTGCAG-3'	71.9	
Kir2.3	F 5'-CTTCTCGCCTCCTTCT-3'	56.7	63
	R 5'-CCGATCATGAAGGAGTCGAT-3'	54.7	
GAPDH	F 5'-TCCCCTGCAGTGCCAGCCGCAACCCGA-3'	81.9	a
	R 5'-GGGCAGCGCCACGGCCATCACGCCACA-3'	83.5	

$T_{m}$ , theoretical primer melting temperature.

<sup>a</sup>The annealing temperature of the internal standard corresponded to that of the mRNA problem in each case.

## **2. Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore**

Amorós I, **Dolz-Gaitón P**, Gómez R, Matamoros M, Barana A, de la Fuente MG, Núñez M, Pérez-Hernández M, Moraleda I, Gálvez E, Iriepa I, Tamargo J, Caballero R, Delpón E. *Biochem Pharmacol.* 2013;86:267-278.





## Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore



Irene Amorós<sup>a,b,1</sup>, Pablo Dolz-Gaitón<sup>a,b,1</sup>, Ricardo Gómez<sup>a,c</sup>, Marcos Matamoros<sup>a,b</sup>, Adriana Barana<sup>a,c</sup>, Marta González de la Fuente<sup>a,c</sup>, Mercedes Núñez<sup>a,b</sup>, Marta Pérez-Hernández<sup>a,c</sup>, Ignacio Moraleda<sup>d</sup>, Enrique Gálvez<sup>d</sup>, Isabel Iriepa<sup>d</sup>, Juan Tamargo<sup>a,c</sup>, Ricardo Caballero<sup>a,b,\*</sup>, Eva Delpón<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Universidad de Alcalá, 28871 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 January 2013

Accepted 25 April 2013

Available online 3 May 2013

#### Keywords:

Propafenone

Human atrial myocytes

$I_{K1}$

PIP<sub>2</sub>

Rectification

Inward rectifier channels

### ABSTRACT

Human cardiac inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) is generated by Kir2.x channels. Inhibition of  $I_{K1}$  could offer a useful antiarrhythmic strategy against fibrillatory arrhythmias. Therefore, elucidation of Kir2.x channels pharmacology, which still remains elusive, is mandatory. We characterized the electrophysiological and molecular basis of the inhibition produced by the antiarrhythmic propafenone of the current generated by Kir2.x channels ( $I_{Kir2.x}$ ) and the  $I_{K1}$  recorded in human atrial myocytes. Wild type and mutated human Kir2.x channels were transiently transfected in CHO and HEK-293 cells. Macroscopic and single-channel currents were recorded using the patch-clamp technique. At concentrations  $>1 \mu\text{M}$  propafenone inhibited  $I_{Kir2.x}$  the order of potency being  $\text{Kir2.3} \sim I_{K1} > \text{Kir2.2} > \text{Kir2.1}$  channels. Blockade was irrespective of the extracellular  $\text{K}^+$  concentration whereas markedly increased when the intracellular  $\text{K}^+$  concentration was decreased. Propafenone decreased inward rectification since at potentials positive to the  $\text{K}^+$  equilibrium potential propafenone-induced block decreased in a voltage-dependent manner. Importantly, propafenone favored the occurrence of subconductance levels in Kir2.x channels and decreased phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)-channel affinity. Blind docking and site-directed mutagenesis experiments demonstrated that propafenone bound Kir2.x channels at the cytoplasmic domain, close to, but not in the pore itself, the binding site involving two conserved Arg residues (residues 228 and 260 in Kir2.1). Our results suggested that propafenone incorporated into the cytoplasmic domain of the channel in such a way that it decreased the net negative charge sensed by  $\text{K}^+$  ions and polyamines which, in turn, promotes the appearance of subconductance levels and the decrease of PIP<sub>2</sub> affinity of the channels.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human Kir2.x channels generate the inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) present in both atrial and ventricular myocytes [1]. Several data suggest that ventricular  $I_{K1}$  is mainly carried by Kir2.1 homotetramers while the relative importance of Kir2.2 and 2.3 subunits is greater at the atrial level [1–3]. The physiological

functions of strong inwardly rectifying channels are related to their unique inward rectification, which allows  $\text{K}^+$  influx but limits  $\text{K}^+$  efflux [1,4]. The prevalent mechanism underlying this property is the voltage-dependent block caused by intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  and polyamines interacting with acidic residues lining the transmembrane (D172) and cytoplasmic pore (E224, E229, D255, and D259 residues in Kir2.1) [4].  $I_{K1}$  is thus critical for the maintenance of the resting membrane potential near the  $\text{K}^+$  equilibrium potential ( $E_K$ ) and for the control of the duration of the final phase of cardiac action potential repolarization and refractoriness [1].

Inward rectifier channels have been implicated in the perpetuation of reentrant tachyarrhythmias in both humans and experimental models [5,6]. Gain- and loss-of-function mutations in the gene that encodes Kir2.1 (KCNJ2) have been reported, and

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 14 70; fax: +34 91 394 14 70.

E-mail address: [rcaballero@med.ucm.es](mailto:rcaballero@med.ucm.es) (R. Caballero).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.

both the  $I_{K1}$  increase and decrease produced by these mutations are associated with ventricular arrhythmias [3,7]. Indeed, mutations that increase the outward component of  $I_{K1}$  lead to short QT syndrome type 3 and severe ventricular arrhythmias, whereas those that decrease the current cause mild QT prolongation yet a burden of ventricular arrhythmias (Andersen–Tawil Syndrome) [3,5,7]. Additionally, atrial fibrillation, the most common arrhythmia, produces an  $I_{K1}$  up-regulation, an increase that is considered critical for the stabilization of the arrhythmia [8,9]. Altogether the results suggested that inhibition of  $I_{K1}$  could offer a potentially useful antiarrhythmic strategy against fibrillatory arrhythmias [5,6]. Moreover, since Kir2.2 and Kir2.3 seem to be the main atrial Kir2.x isoforms, the selective modulation of Kir2.2–2.3 channels as an atrial selective target for the design of new antiarrhythmic agents could be proposed [10].

Nowadays there is a huge amount of information on the pharmacology of human cardiac voltage-dependent  $K^+$  (Kv) channels. Aside toxins, which bind the extracellular mouth of the pore, blocking drugs act as open channel blockers by binding to receptor sites that share a similar topology among the different cardiac Kv channels and that are located in the lumen of the aqueous pore of the channel [11]. Conversely, pharmacology of Kir2.x channels remains elusive. It has been described that chloroquine inhibits  $I_{K1}$  in a voltage-dependent manner by binding to Kir2.1 residues located in the cytoplasmic pore and implicated in the polyamines binding [12]. Other drugs, such as tamoxifen, mefloquine and carvedilol, inhibit  $I_{K1}$  by binding phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) avoiding the critical interaction of the channel with this mediator [13–15]. Recently, it has been demonstrated that flecainide, a class Ic antiarrhythmic drug, selectively increases the  $I_{K1}$  generated by homotetramers of Kir2.1 channels ( $I_{Kir2.1}$ ) by binding to C311, a residue located at the cytoplasmic domain of the channel [2]. Therefore, even when the information is extremely limited, it is suspected that Kir2.x pharmacological modulation mechanism is more diverse than those of Kv channels.

Here we analyzed the effects of propafenone, another class Ic antiarrhythmic drug [16], to take a step forward in our knowledge of the pharmacological modulation of Kir2.x channels. The results suggested that propafenone blocks Kir2.x channels by binding to the cytoplasmic domain at a site located at the interface of subunits. Binding of propafenone promotes the occurrence of subconductance levels in the channel gating due to the decrease of the  $K^+$  concentration in the pore and of the affinity of the channel for  $PIP_2$ . Therefore, the present results provide evidence for a novel mechanism of Kir channels drug blockade that could be of potential therapeutic interest.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Human atrial myocyte isolation

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Gregorio Marañón (CNIC-13) and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent. Data regarding age, sex, type of surgery, and pharmacological treatment of the patients are included in Table 1. Human right atrial samples were obtained from patients ( $n=5$ ) that underwent cardiac surgery. Atrial myocytes were isolated by using collagenase type I (Worthington, USA) and protease type XXIV (Sigma Chemical Co., United Kingdom) following previously described methods [17].

### 2.2. Kir2.x constructs and cell transfection

Human Kir2.1 wild type (WT) and L222I Kir2.1 cDNA were kindly provided by Dr. J. Jalife (Michigan University, USA) and Dr. I.

**Table 1**

Patient characteristics.

Patients (n)	5
Mean age (years)	65 ± 4
Male/Female (n)	4 (80%)/1 (20%)
Cardiopathy	
Valvular (n)	3 (60%)
Ischemic (n)	1 (20%)
Combined (n)	1 (20%)
Hypertension (n)	5 (100%)
Diabetes mellitus (n)	2 (40%)
Dyslipidemia (n)	3 (60%)
Ejection fraction (%)	58.8 ± 1.1
NYHA functional class	
I (n)	1 (20%)
II (n)	4 (80%)
III (n)	0 (0%)
IV (n)	0 (0%)
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.2
Pulmonar systolic pressure (mm Hg)	46.3 ± 5.6
Treatment	
ACE inhibitors/ARBs (n)	4 (80%)
Statins (n)	3 (60%)
Acetylsalicylic acid (n)	3 (60%)
Beta blockers (n)	2 (40%)
Calcium antagonists (n)	0 (0%)

ACE, angiotensin converting enzyme; ARBs, angiotensin II type 1 receptor blockers; CABG, coronary artery bypass grafting; NYHA: New York Heart Association.

Levitan (Columbia University, USA), respectively. D172A, E224A, D259A, E299A Kir2.1, WT Kir2.2, WT and I213L Kir2.3 cDNA were provided by Dr. J. Sánchez-Chapula (Colima University, Mexico). Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3 were subcloned into pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen, USA). D255R, R228A, R228Q, R260A, R260Q Kir2.1, R229A, R229Q Kir2.2, and R220Q, R252Q Kir2.3 mutants were made by using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA) [2,18]. All mutations were confirmed by direct DNA sequencing. CHO cells, cultured as previously described [2,17,18], were transiently transfected with the cDNA encoding WT or mutated Kir2.x channels (1.6  $\mu$ g) together with the cDNA encoding the CD8 antigen (0.5  $\mu$ g) by using FUGENE XtremeGENE (Roche Diagnostics, Switzerland) following manufacturer instructions. Coexpression experiments (Kir2.1/Kir2.2, Kir2.1/Kir2.3, Kir2.2/Kir2.3) were performed using an 1:1 ratio. Activation kinetics of the heterotetramers were significantly different from those of the respective homotetrameric channels, demonstrating the heterotetrameric nature of the channels [2].

48 h after transfection, cells were incubated with polystyrene microbeads precoated with anti-CD8 antibody (Dynabeads M450; Life Technologies, United Kingdom). Most of the cells that were beaded also had channel expression.

### 2.3. Macroscopic current recordings

Macroscopic currents were recorded at room temperature (21–23 °C) using the whole cell patch-clamp technique using an Axopatch-200B patch clamp amplifier (Molecular Devices, USA) [2,17–19]. Recording pipettes were pulled from 1.0 mm o.d. borosilicate capillary tubes (GD1, Narishige Co., Ltd, Japan) using a programmable patch micropipette puller (Model P-2000 Brown-Flaming, Sutter Instruments Co., USA). Micropipette resistance was kept below 3.5 M $\Omega$  when filled with the internal solution and immersed in the external solution. In all experiments series resistance was compensated manually and  $\geq 80\%$  compensation was achieved. In CHO cells, uncompensated access resistance and cell capacitance were  $2.7 \pm 0.2$  M $\Omega$ , and  $11.3 \pm 0.8$  pF, respectively ( $n=75$ ), whereas mean maximum Kir2.1, Kir2.2, and Kir2.3 currents ( $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$ , and  $I_{Kir2.3}$ ) amplitudes at  $-120$  mV were  $-2.0 \pm 0.2$  (n = 36),  $-1.0 \pm 0.1$  (n = 18), and  $-0.5 \pm 0.1$  nA (n = 21), respectively.

In human atrial myocytes mean maximum  $I_{K1}$  amplitude at  $-100$  mV, uncompensated access resistance, and capacitance averaged  $-679 \pm 108$  pA,  $2.6 \pm 0.8$  M $\Omega$ , and  $77.1 \pm 9.8$  pF ( $n = 24$ ), respectively. Thus, under our experimental conditions no significant voltage errors ( $<5$  mV) due to series resistance were expected with the micropipettes used. To record human atrial  $I_{K1}$ , the external solution contained (mM): NaCl 120, KCl 20, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, 4-aminopyridine 1, glucose 10, nifedipine (1  $\mu$ M), atropine (1  $\mu$ M), and glibenclamide (10  $\mu$ M) (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing (mM): K-aspartate 80, KCl 42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, MgATP 5, phosphocreatine 3, HEPES 5, and EGTA 5 (pH 7.2 with KOH). To record  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$ , and  $I_{Kir2.3}$  CHO cells were perfused with an external solution containing (mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, and glucose 10 (pH 7.4 with NaOH). The liquid junction potential (LJP) between the pipette and external solution was  $-13.2$  mV. In some experiments,  $I_{Kir2.1}$  were recorded at 100 (LJP =  $-9.4$  mV), or 140 (LJP =  $-8.0$  mV) mM extracellular K<sup>+</sup> concentration ( $[K^+]_o$ ). R228A, R228Q, R260A, R260Q  $I_{Kir2.1}$ , R229A, R229Q  $I_{Kir2.2}$ , and R220Q, R252Q  $I_{Kir2.3}$  were recorded at 140 mM  $[K^+]_o$ . To obtain 100 and 140 mM  $[K^+]_o$  solutions, equimolar substitution between KCl and NaCl was used. The internal solution used for whole-cell current recordings in CHO cells was the same as described for recording native  $I_{K1}$  (see above). In some experiments the total intracellular K<sup>+</sup> concentration ( $[K^+]_i$ ) was lowered to 25% by the equimolar substitution of K-aspartate and KCl by TrisCl (LJP =  $-2.4$  mV) [19]. All current–voltage ( $I$ – $V$ ) curves were corrected according to the calculated LJP [2,18].

#### 2.4. Single channel recordings

Single channel currents were recorded at room temperature using the cell-attached patch-clamp configuration [2,18]. Cells were suspended in bath solution (in mM: KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, and glucose 10; pH 7.4 with KOH). Patch pipettes were pulled from 1.5 mm o.d. borosilicate capillary tubes (Harvard Apparatus Ltd, USA), coated at the tip with Sylgard (Dow Corning, USA), and fire-polished with a microforge (MF130-Narishige, Japan). When filled with pipette solution (in mM: KCl 140 and HEPES 10; pH 7.4 with KOH), tip resistances were between 5 and 10 M $\Omega$ . Patches with more than one channel were discarded.

#### 2.5. Inside-out recordings

In some experiments, currents were recorded at room temperature from excised inside-out macropatches from HEK-293 cells [2]. Recordings were made by using a fluoride, vanadate, and pyrophosphate (FVPP)-potassium solution on both sides of the patch containing (in mM): KCl 123, K<sub>2</sub>EDTA 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.1, KF 5, K<sub>4</sub>HP<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 (pH 7.2 with KOH) to prevent current rundown [2]. This solution was Mg<sup>2+</sup>- and spermine-free. A solution adjusted to pH 5.0 was used to abolish any detectable currents through Kir channels. Off-line subtraction of the currents recorded when perfusing with this solution was used to subtract endogenous currents. Patch pipettes were pulled from 1.0 mm o.d. borosilicate capillary tubes (GD1, Narishige Co., Ltd, Japan). When filled with FVPP solution, tip resistances were between 1.0 and 1.5 M $\Omega$ .

#### 2.6. Pulse protocols and analysis

The protocol to record human atrial  $I_{K1}$  consisted of 50-ms steps from  $-80$  to  $-100$  mV followed by depolarizing ramps to  $-10$  mV (800 ms) [2,18]. For macroscopic  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$ , and  $I_{Kir2.3}$  recorded in the presence of 4 mM  $[K^+]_o$ , the protocol to obtain  $I$ – $V$  curves consisted of 250-ms pulses in 10 mV increments from  $-60$  mV to potentials between  $-120$  and  $+20$  mV [2,18]. At 100 and 140 mM

$[K^+]_o$ ,  $I_{Kir2.1}$  was recorded by applying 250 ms-pulses from  $+10$  mV to potentials ranging  $-60$  and  $+90$  mV. In all cases, the current amplitude was measured at the end of the pulse. Current recordings were sampled at 4 kHz and filtered at half the sampling frequency.

To obtain the EC<sub>50</sub> (concentration that produces the half maximum effect) and the IC<sub>50</sub> (concentration that produces the half maximum inhibition) and the Hill coefficient ( $n_H$ ), the blockade produced by propafenone or the increase produced by PIP<sub>2</sub> at various concentrations  $[D]$  were fitted to the Hill equation.

Single channel currents were recorded by applying 10-s pulses from a holding potential of 0 mV to  $-80$  mV [2,18], digitized at 10 kHz and filtered at 1 kHz. Data were analyzed using pCLAMP software (Molecular Devices, USA). Open probability ( $P_o$ ) was calculated in each experiment by dividing the time that the channel remains in the open state by the total recording time. The opening frequency ( $f_o$ ) was calculated for each experiment as the inverse of the closed time between events. Amplitude of unitary currents in control conditions and in the presence of propafenone were calculated for each experiment from a Gaussian distribution fit to amplitude histograms that were constructed by plotting amplitude data as a function of the number of events per bin (bin width = 0.05 pA). Open- and closed-time constants ( $\tau_o$  and  $\tau_c$ ) were calculated for each experiment from the Gaussian distribution fit to dwell-time histograms that were constructed by plotting log of the dwell-time data as a function of the number of events per bin. Mean open time (MOT) was calculated by dividing the total open dwell-time by the number of openings.

Inside-out recordings were performed by applying 500-ms pulses from a holding potential of  $-70$  mV to potentials ranging  $-90$  and  $+50$  mV, followed by a second 500-ms pulse to  $-80$  mV. Currents were digitized at 2 kHz and filtered at 1 kHz. Spermine-induced block was measured as the reduction of the total charge crossing the membrane (calculated as current-time integrals at  $+50$  mV).

#### 2.7. Blind docking of propafenone on Kir2.2

Propafenone was assembled as hydrochloride within Discovery Studio (version 2.1 software package; Accelrys Software Inc., USA) using standard bond lengths and bond angles. With the CHARMM (Accelrys Software Inc.) force field [20] and partial atomic charges, the molecular geometry of propafenone was energy-minimized using the adopted-based Newton–Raphson algorithm. Structure was considered fully optimized when the energy changes between iterations were less than 0.01 kcal/mol [21]. Crystal structure of Kir2.2 channel from chicken (PDB ID: 3JYC) was used for the molecular modeling [22]. The software PISA (<http://pdbe.org/pisa/>) predicts that the crystal form of Kir2.2 may form a tetramer. For docking studies, initial protein was prepared by removing heteroatoms (K<sup>+</sup>). Proper bonds, bond orders, hybridization, and charges were assigned using protein model tool in Discovery Studio. CHARMM force field was applied using the receptor–ligand interactions tool in Discovery Studio.

The binding sites of propafenone within Kir2.2 were identified by automated ligand docking (“blind docking”) using the program Autodock Vina (MGL Tools, USA) [23]. AutoDockTools software (ADT; version 1.5.4) was used to add hydrogens and partial charges for proteins and ligands using Gasteiger charges. All rotational bonds in ligand were set to free, while the protein side chains remain fixed. A grid box of 60  $\times$  60  $\times$  72 with grid points separated 1 Å, was positioned at the middle of the protein. Default parameters were used except number of modes, which was set to 40. Fifty independent docking runs were carried out for propafenone. According to Vina best scored poses, the most stable complex configurations were considered.

## 2.8. Drugs

Propafenone (Sigma) was initially dissolved in methanol to yield 10 mM stock solutions. Drug solutions were prepared freshly for each experiment. Glibenclamide, atropine, nifedipine, PIP<sub>2</sub> sodium salt, and spermine were purchased from Sigma as a powder and dissolved as appropriate to yield 10 mM stock solutions. Further dilutions were carried out in external solution to obtain the desired final concentration. Control solutions always contained the same solvent concentrations as the test solution.

## 2.9. Statistical methods

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Paired or unpaired *t* test or one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. To make comparisons between two different concentration–response curves, an F-test was used. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

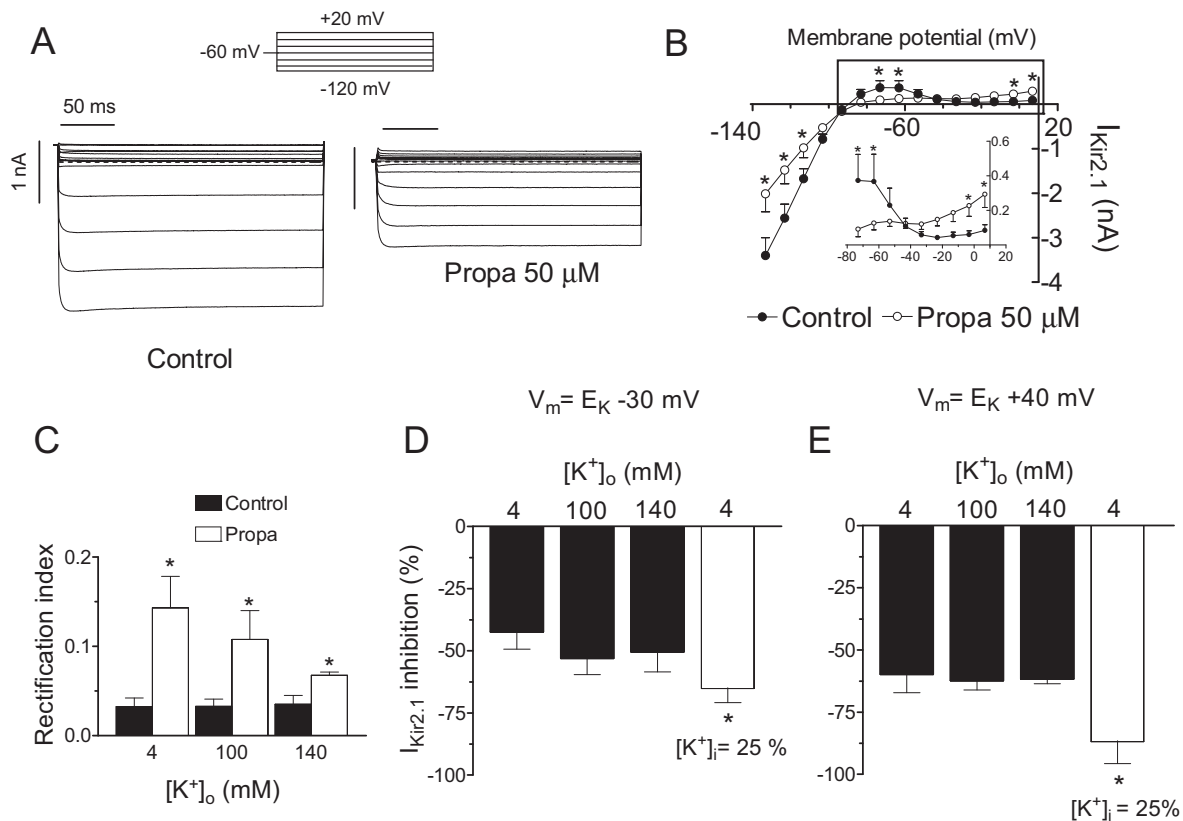
## 3. Results

Fig. 1A shows  $I_{Kir2.1}$  traces recorded in a CHO cell transiently transfected with Kir2.1 channels by applying 250-ms pulses from a holding potential of  $-60$  mV to potentials ranging  $-120$  and  $+20$  mV under control conditions and in the presence of  $50 \mu\text{M}$  propafenone. Propafenone significantly decreased both inward ( $42.4 \pm 6.9\%$  at  $-120$  mV) and outward  $I_{Kir2.1}$  ( $55.3 \pm 7.4\%$  at  $-50$  mV,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$  vs control) (Fig. 1A), an effect completely reversible upon washout. Fig. 1B shows the current–voltage ( $I$ – $V$ ) relationship obtained in the absence and presence of propafenone  $50 \mu\text{M}$ .

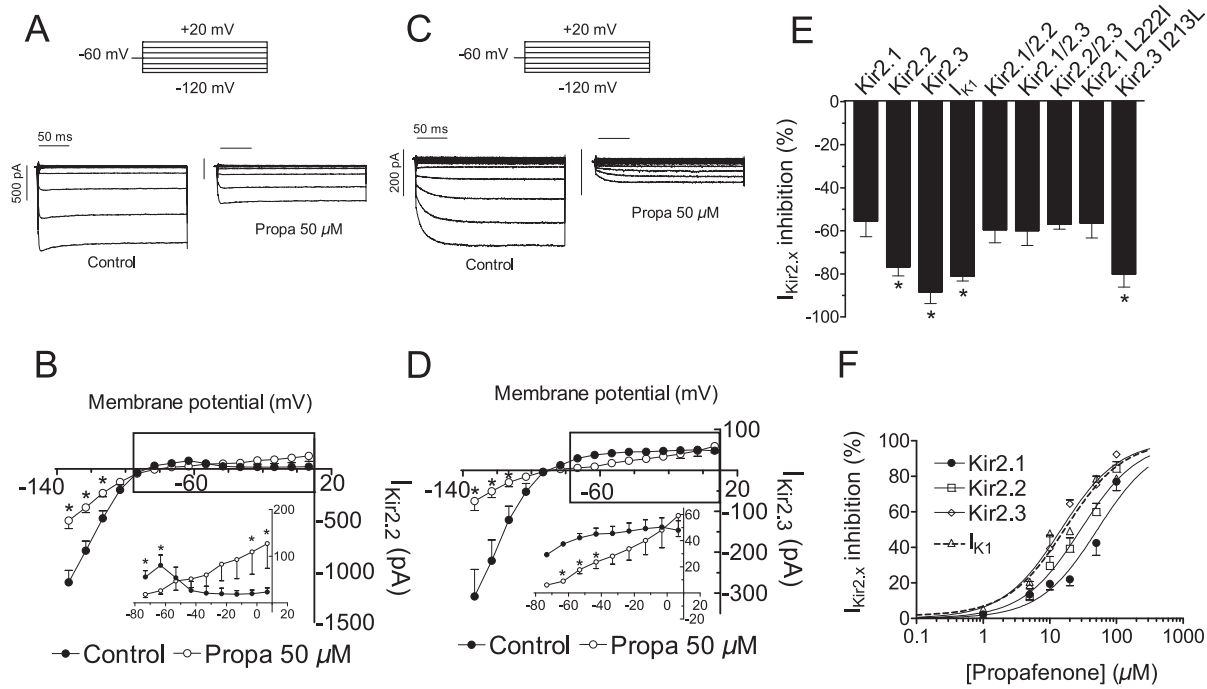
Surprisingly, in the presence of propafenone, current generated at potentials positive to the  $E_K$  was a linear function of the voltage (inset in Fig. 1B). Indeed, at potentials positive to the  $E_K$  the propafenone-induced block decreased in a voltage-dependent manner. To quantify this phenomenon the  $I_{Kir2.1}$  rectification index was calculated by dividing the current amplitude generated by the most depolarized pulse by the current amplitude generated by the most hyperpolarized pulse. Fig. 1C demonstrated that propafenone decreased the inward rectification.

We also tested the propafenone blocking effects in the presence of different  $[K^+]_o$  and when  $[K^+]_i$  was decreased by 75%. Interestingly, the degree of block of both outward and inward current was irrespective of the  $[K^+]_o$ , while the blockade significantly increased when  $[K^+]_i$  was reduced by 75% (Fig. 1D/E). Furthermore, the propafenone-induced decrease of current rectification resulted to be more marked at low than at high  $[K^+]_o$  (Fig. 1C).

Fig. 2A and C shows  $I_{Kir2.2}$  and  $I_{Kir2.3}$  records while panels B and D show their respective  $I$ – $V$  curves. The results demonstrated that propafenone also inhibited inward and outward currents generated by Kir2.2 and Kir2.3 homotetramers. Furthermore, we also tested the effects produced by propafenone on cells cotransfected (1:1 ratio) with both Kir2.1 and Kir2.2 (Kir2.1/2.2), with Kir2.1 and Kir2.3 (Kir2.1/2.3), and with Kir2.2 and Kir2.3 (Kir2.2/2.3). Fig. 2E shows the percentage of  $50 \mu\text{M}$  propafenone-induced inhibition on the currents recorded at  $40$  mV positive to the  $E_K$  demonstrating that propafenone also inhibited  $I_{Kir2.x}$  generated by heterotetramers. Accordingly with this result, propafenone also inhibited both inward and outward  $I_{K1}$  recorded in human atrial myocytes ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ) which is probably generated by Kir2.x



**Fig. 1.** Propafenone inhibits  $I_{Kir2.1}$ . A and B,  $I_{Kir2.1}$  traces recorded by applying the protocol shown at the top (A) and  $I$ – $V$  curves for currents measured at the end of the pulses (B) in the absence and presence of  $50 \mu\text{M}$  propafenone. Inset in B shows data at potentials positive to  $E_K$  on an expanded scale. \* $P < 0.05$  vs control. C, Rectification index calculated at 4, 100, and 140 mM  $[K^+]_o$  in control conditions and in the presence of  $50 \mu\text{M}$  propafenone. \* $P < 0.05$  vs control. D and E, Percentage of inhibition induced by  $50 \mu\text{M}$  propafenone on the  $I_{Kir2.1}$  recorded at 30 mV negative (D) or at 40 mV positive (E) to the  $E_K$  at different  $[K^+]_o$  and when the  $[K^+]_i$  was reduced to 25% (35 mM). \* $P < 0.05$  vs inhibition of currents recorded at 140 mM  $[K^+]_o$ .



**Fig. 2.** Propafenone inhibits  $I_{Kir2,x}$ . A and C,  $I_{Kir2,2}$  and  $I_{Kir2,3}$  traces recorded by applying the protocol shown at the top. B and D,  $I-V$  curves for  $I_{Kir2,2}$  and  $I_{Kir2,3}$  measured at the end of the pulses in the absence and presence of 50  $\mu$ M propafenone. Insets show data at potentials positive to  $E_K$  on an expanded scale. \* $P < 0.05$  vs control. E, Percentage of 50  $\mu$ M propafenone-induced inhibition on the currents recorded at 40 mV positive to  $E_K$ . \* $P < 0.05$  vs Kir2.1. F, Percentage of  $I_{Kir2,1}$ ,  $I_{Kir2,2}$ ,  $I_{Kir2,3}$ , and human atrial  $I_{K1}$  inhibition at 30 mV negative to  $E_K$  as a function of the different concentrations of propafenone tested. In B and D–F, each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $\geq 5$  experiments.

heterotetramers (Fig. 2E). Native  $I_{K1}$  was recorded in the presence of atropine and glibenclamide to block the acetylcholine-activated component ( $I_{KACH}$ ) and the ATP-sensitive ( $I_{KATP}$ ) inward rectifier currents, respectively.

Fig. 2F shows the concentration–response curves constructed by plotting the propafenone-induced inhibition of inward  $I_{Kir2,1}$ ,  $I_{Kir2,2}$ ,  $I_{Kir2,3}$ , and human atrial  $I_{K1}$  at 30 mV negative to the  $E_K$  as a function of the propafenone concentration tested. The  $IC_{50}$  and the  $n_H$  were calculated by fitting the Hill equation to the data. Interestingly, the  $IC_{50}$  for  $I_{Kir2,1}$  ( $51.8 \pm 6.2 \mu$ M) was significantly higher than those obtained for  $I_{Kir2,2}$  ( $29.1 \pm 3.4 \mu$ M),  $I_{Kir2,3}$  ( $14.7 \pm 3.1 \mu$ M), and human atrial  $I_{K1}$  ( $16.8 \pm 6.1 \mu$ M). It should be noted that human atrial  $I_{K1}$  sensitivity was similar to that of Kir2.3 channels, which further supported the predominant role of these channels over Kir2.1 in generating this current [2].

### 3.1. Propafenone decreases PIP<sub>2</sub>-channel interactions

Propafenone-induced block showed an inverse correlation to the strength of channel-PIP<sub>2</sub> interaction (greater for Kir2.1 than for Kir2.3 channels). Thus, we next studied the effects of propafenone on L222I Kir2.1 and in I213L Kir2.3 channels, mutations that decrease and increase, respectively, the Kir2.1 and Kir2.3 channel affinity for PIP<sub>2</sub> [1,4]. Strikingly, propafenone-induced block was not different to that observed in their respective WT channels (Fig. 2E).

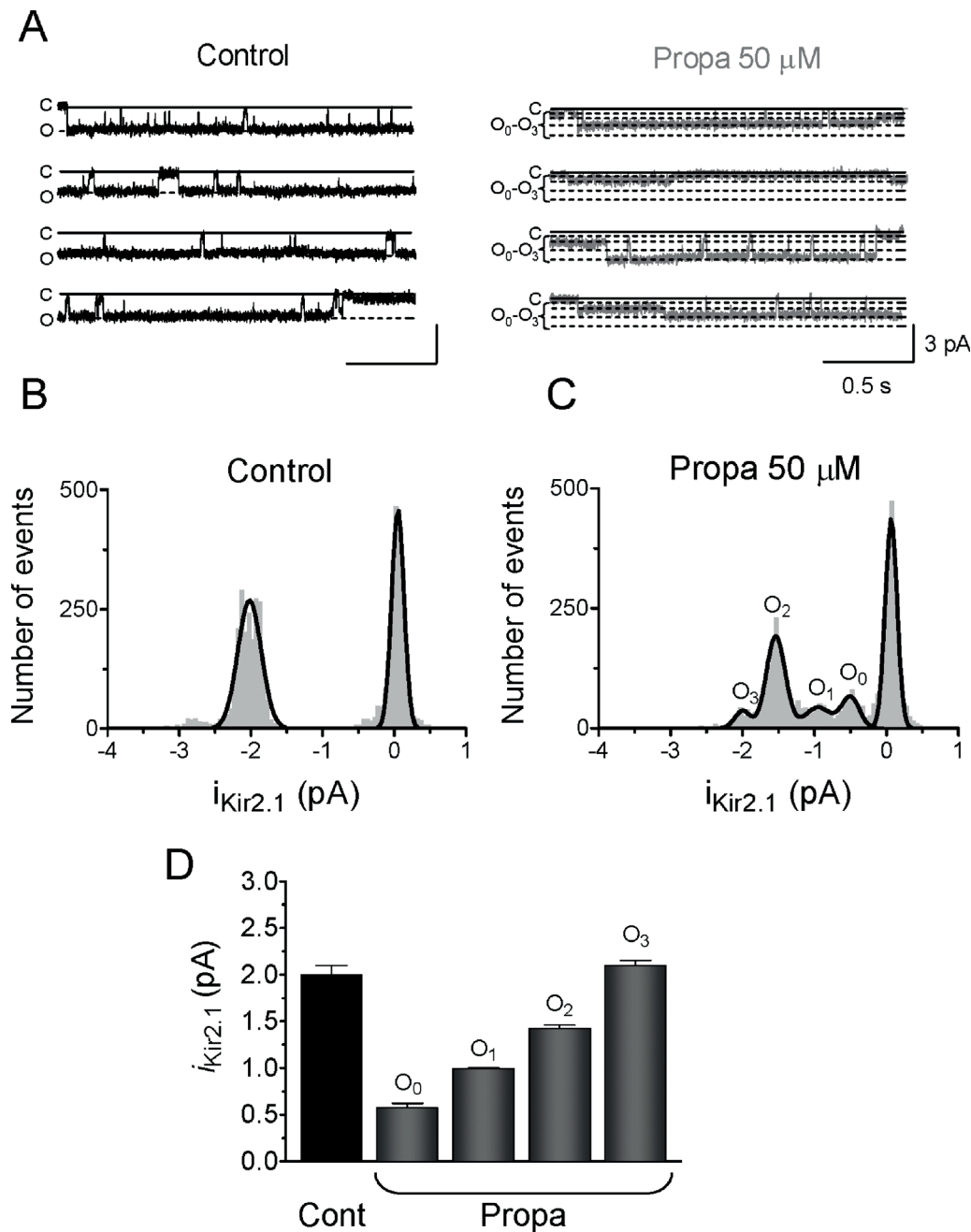
To analyze the effects of blocking propafenone concentrations at the single channel level we decided to use Kir2.1 channels, since their gating properties have been extensively studied. Fig. 3A shows single channel currents recorded by applying 10-s pulses from 0 to  $-80$  mV in CHO cells transiently transfected with Kir2.1 channels in the presence and absence of 50  $\mu$ M propafenone. Under control conditions, channels exhibited a  $P_o$  of  $0.69 \pm 0.05$ , with a  $f_o$  value of  $2.4 \pm 0.2$  Hz ( $n = 8$ ). Moreover, the fit of a Gaussian distribution to amplitude histograms yielded discrete peaks at  $0.01 \pm 0.001$  pA (closed channels) and  $-2.0 \pm 0.1$  pA (open channels)

(Fig. 3B). Remarkably, propafenone induced a significant change in channel gating characterized by the occurrence of subconductance levels (Fig. 3A). In the presence of drug, amplitude histograms (Fig. 3C) showed peaks corresponding to sublevels with mean amplitudes of  $\approx 1/4$  ( $O_0$ ),  $\approx 1/2$  ( $O_1$ ), and  $\approx 3/4$  ( $O_2$ ) of the fully open level ( $O_3$ ). Interestingly, mean amplitude of the fully open level was similar to that of control conditions (Fig. 3D). The most frequently observed sublevel was  $O_2$  (Fig. 3C) with a  $P_o$  of  $0.26 \pm 0.1$  and a MOT of  $295 \pm 119$  ms (Fig. 4A and B). Open- and closed-time constants ( $\tau_o$  and  $\tau_c$ ) were calculated for each experiment from the Gaussian distribution fit to histograms that were constructed by plotting log of dwell-time data as a function of the number of events per bin. Fig. 4C shows that mean  $\tau_o$  values for  $O_0$  and  $O_2$  were significantly lower than those of  $O_1$  and  $O_3$  while propafenone did not significantly modify  $\tau_c$  (Fig. 4D). It has been described that the disruption of PIP<sub>2</sub>-channel interaction favors the occurrence of subconductance levels in Kir2.x channels [24]. Thus, these results also suggested that a PIP<sub>2</sub>-related mechanism was responsible for the effects of propafenone.

Fig. 5A shows  $I_{Kir2,1}$  traces recorded in excised inside-out macropatches by applying 500-ms pulses from  $-90$  mV to potentials ranging  $-90$  and  $+50$  mV in the absence and presence of 50  $\mu$ M propafenone. Application of propafenone at the internal side of the membrane significantly inhibited the current at potentials negative ( $43.8 \pm 5.2\%$  at  $-90$  mV) and positive ( $56.9 \pm 7.3\%$  at  $+50$  mV) to the  $E_K$  (Fig. 5A and B). Interestingly, steady-state block was reached after  $\sim 12$  min of drug perfusion, a slow onset block time course similar to that observed when the drug was perfused extracellularly under whole-cell configuration (Fig. 5C). These results suggested that  $I_{Kir2,1}$  inhibition was not due to Kir2.1 pore block.

Neomycin is a polycationic aminoglycoside antibiotic that reduces Kir channel activity by screening PIP<sub>2</sub> molecules. Analysis of the kinetics of inhibition by neomycin has been previously used as a reliable measurement of the strength of the channel-PIP<sub>2</sub> interaction [24]. Indeed, the stronger the channel-PIP<sub>2</sub> interaction, the slower the inhibition. Thus, we measured the rate of current





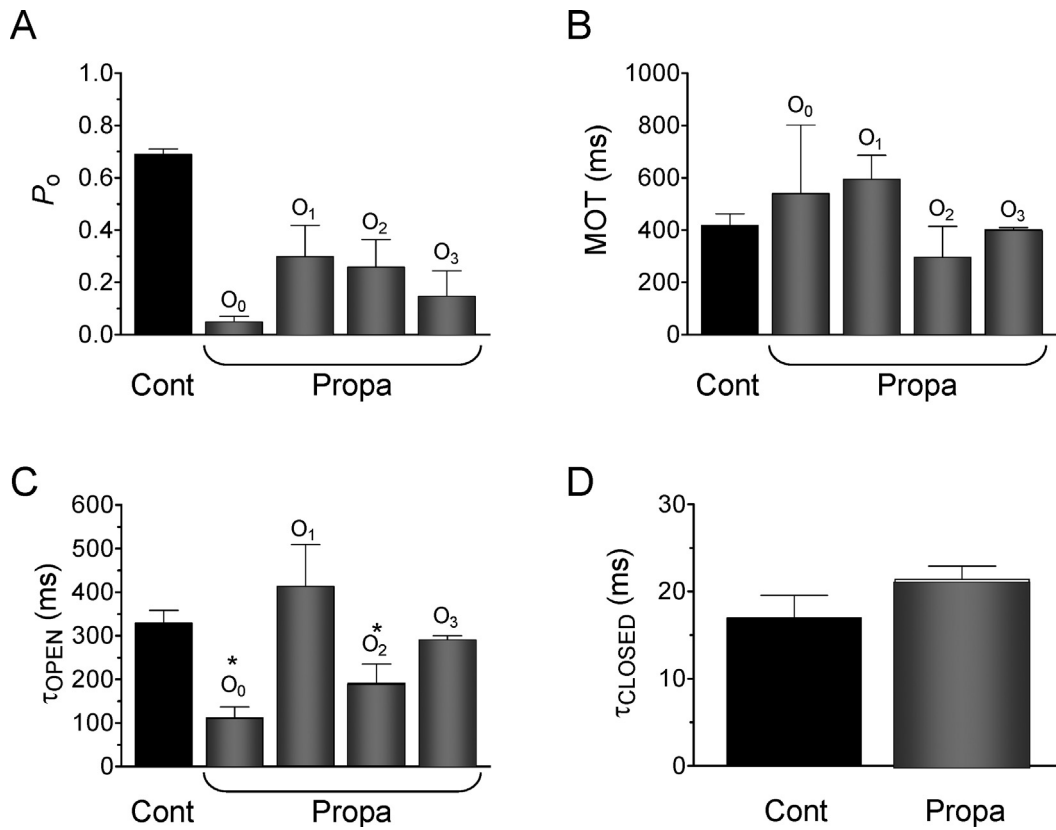
**Fig. 3.** Propafenone induces subconductance levels in Kir2.1. **A**, Single channel recordings at  $-80$  mV under control conditions and after perfusion with  $50 \mu\text{M}$  propafenone. Closed and open channel levels are indicated by C and O, respectively. **B** and **C**, Amplitude histograms at  $-80$  mV in the absence (**B**) and presence (**C**) of propafenone constructed by plotting amplitude data from 6 experiments as a function of the number of events per bin (bin width =  $0.05$  pA) together with the fit of a Gaussian function. The fit to the open channel data in the presence of propafenone required a four component Gaussian equation. **D**, Mean unitary current amplitude under control conditions and in the presence of propafenone. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments.

inhibition produced by  $1$  mM neomycin as the time required for the current to decrease by  $50\%$  ( $T_{50}$ ) (Fig. 5D). In the absence of propafenone, neomycin decreased  $I_{Kir2.1}$  with a  $T_{50}$  of  $5.2 \pm 1.0$  min. In the presence of propafenone, the  $T_{50}$  of neomycin-induced rundown was significantly reduced ( $1.1 \pm 0.1$  min), suggesting that the channel-PIP<sub>2</sub> interaction is weaker in the presence of propafenone.

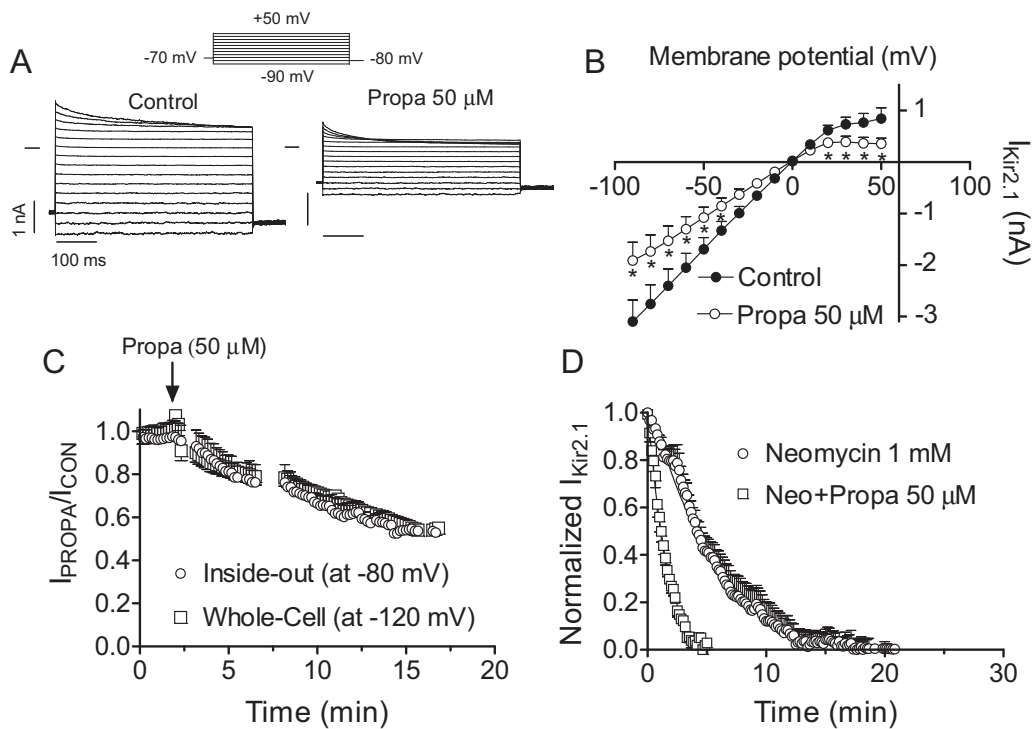
We further examined the effects of propafenone on the channel-PIP<sub>2</sub> interaction by applying different PIP<sub>2</sub> concentrations to inside-out macropatches as previously described [24,25]. Immediately after patch-excision,  $1$  mM neomycin was applied until the complete rundown of the current ( $\approx 20$  min) (Fig. 6A). Afterwards, increasing concentrations of PIP<sub>2</sub> were applied until

current amplitude was fully recovered. In the presence of propafenone, PIP<sub>2</sub> failed to recover the current amplitude since its activating effects were markedly reduced (Fig. 6B). Fig. 6C shows the concentration dependence of the PIP<sub>2</sub> increasing effects. As can be observed, propafenone significantly increased the  $EC_{50}$  (from  $1.6 \pm 0.4$  to  $6.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) and decreased the maximum effect ( $E_{max}$ ) (from  $88.0 \pm 11.0\%$  to  $46.0 \pm 7.7\%$ ), suggesting that propafenone antagonizes the Kir2.1 channels activating effect of PIP<sub>2</sub>.

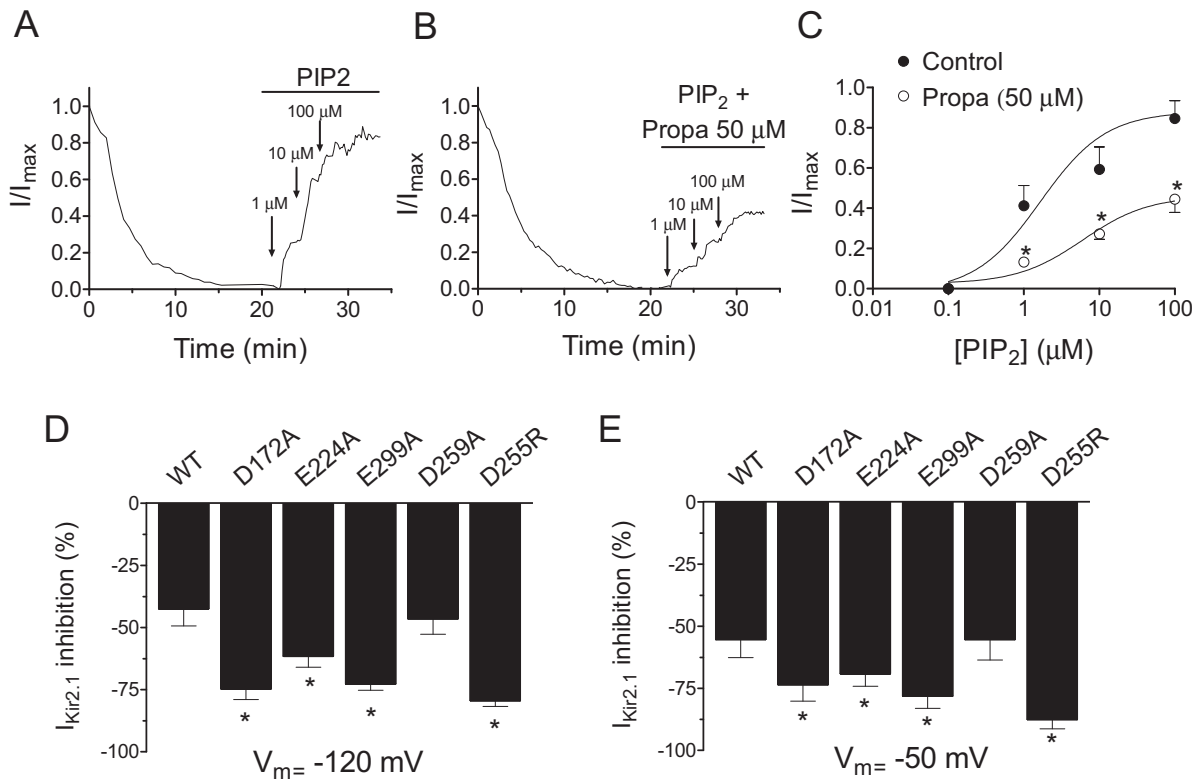
It has been proposed that long polyamines strengthen the channel-PIP<sub>2</sub> interaction by acting as co-factors in PIP<sub>2</sub> regulation of channel activity [26]. In fact, mutant channels that exhibit low polyamines affinity also exhibit low PIP<sub>2</sub> affinity [26]. Therefore, we next assessed the effects of propafenone on D172A, E224A,



**Fig. 4.** Effects of propafenone on channel gating. Mean  $P_o$  (A), open time (B),  $\tau_o$  (C) and  $\tau_c$  (D) in the absence and presence of propafenone. Each bar represents the mean ± SEM of 6 experiments. \* $P < 0.05$  vs  $O_1$  and  $O_3$ .



**Fig. 5.** Effects of propafenone on  $I_{Kir2.1}$  recorded in excised inside-out patches. A, Current traces recorded by applying the protocol shown at the top in excised inside-out patches from HEK-293 cells expressing Kir2.1 channels in control conditions and after cytoplasmic surface application of 50  $\mu$ M propafenone. Horizontal lines represent the zero current level. B,  $I$ - $V$  curves for  $I_{Kir2.1}$  recorded in inside-out patches in the absence and presence of propafenone. \* $P < 0.05$  vs control. C, Time course of propafenone-induced block of  $I_{Kir2.1}$  recorded under the whole-cell configuration or in excised inside-out patches. D, Time course of neomycin-induced block of  $I_{Kir2.1}$  recorded in excised inside-out patches in the absence and presence of 50  $\mu$ M propafenone. Each point represents the mean ± SEM of  $\geq 6$  experiments.



**Fig. 6.** Propafenone decreases channel affinity for PIP<sub>2</sub>. Normalized  $I_{Kir2.1}$  as a function of time in the presence of neomycin and increasing concentrations of PIP<sub>2</sub> in the absence (A) or presence (B) of propafenone. C, Normalized current increase at  $-80$  mV in excised inside-out patches as a function of PIP<sub>2</sub> concentrations in the absence (control) and presence of propafenone. Continuous lines represent the fit of the Hill equation to the data. \* $P < 0.05$  vs control. D and E, Percentage of propafenone-induced inhibition of  $I_{Kir2.1}$  recorded at  $-120$  mV (D) or at  $-50$  mV (E) in CHO cells expressing WT, D172A, E224A, E299A, D259A, and D255R channels. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $\geq 6$  experiments.

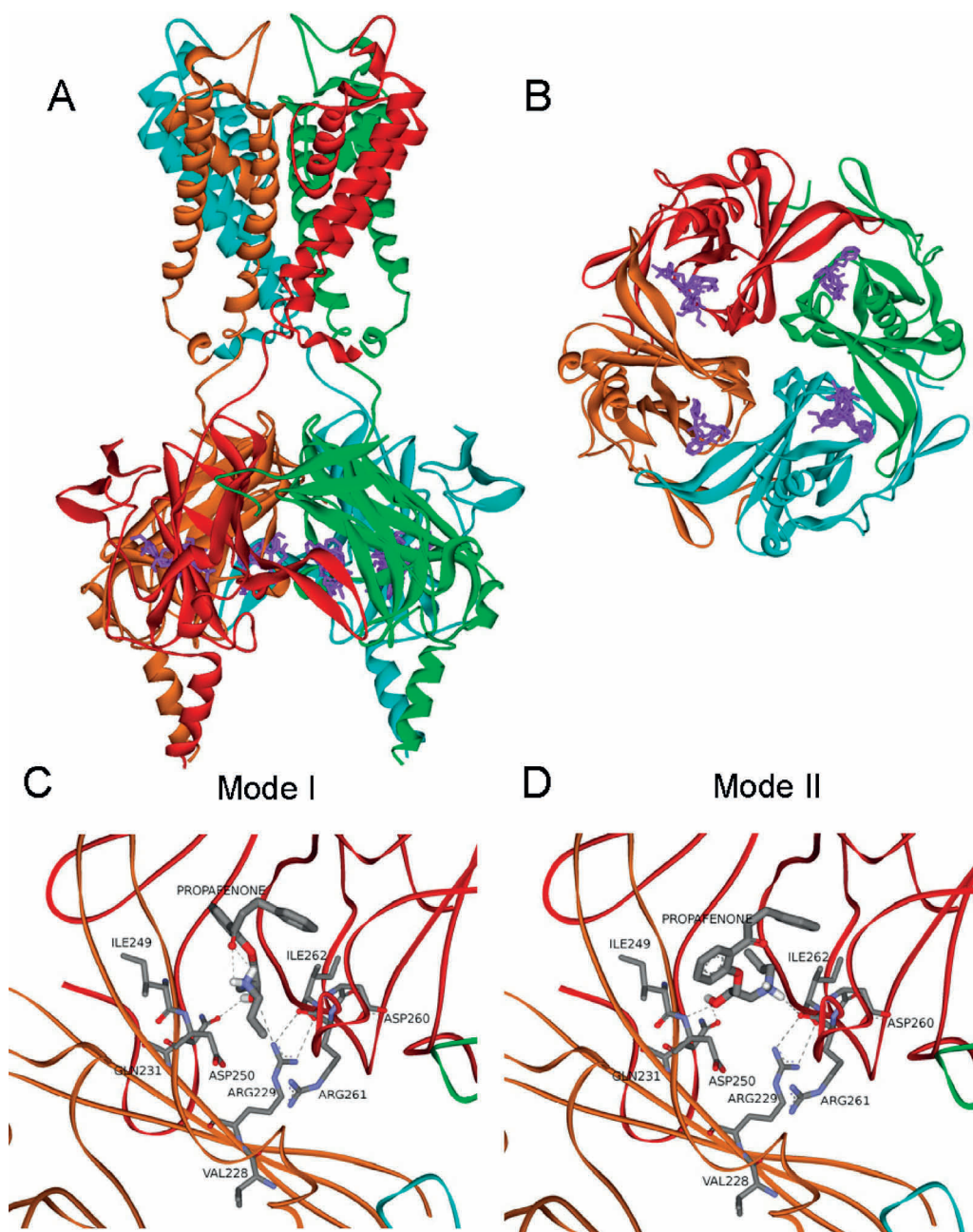
D255R, D259A, and E299A channels by using the whole-cell configuration (Fig. 6D and E). The results demonstrated that in all these mutants, except D259A, propafenone-induced block was significantly greater than in Kir2.1 WT channels.

### 3.2. Binding site of propafenone within Kir2.x channels

To explore the binding site responsible for the blocking effect of propafenone, we performed a blind docking for propafenone with a full-length channel composed by the crystal structure of tetrameric Kir2.2 channels. Kir2.2 channels were selected because they were the first full-length eukaryotic Kir channels crystallized [22]. The docking analysis of propafenone within the transmembrane and cytoplasmic domains of Kir2.2 revealed that it bound more effectively to the cytoplasmic domain (Fig. 7A). There were four propafenone-binding pockets, located at the region between two subunits and out of the ion-conduction pathway (Fig. 7B). The docking results predicted that, due to its flexible structure, propafenone had two major predicted binding modes, both located in an overlapping region (Fig. 7 and Fig. 8). In mode I (Fig. 7C), propafenone adopted a folded conformation in which its hydroxyl group formed hydrogen bonds with the carbonyl oxygen atom of Q231 and with the guanidinium group of R229. There was also a hydrophobic interaction between propafenone phenyl-ring and I270 and L271 side chains (Fig. 8A). In mode II (Fig. 8B), the hydroxyl group of propafenone formed a hydrogen bond with the amino group of D250 (Fig. 7D). Additionally, the positively charged alkylamino nitrogen made a hydrogen bond with R261, which is located in the adjacent subunit. Therefore, the phenyl ring and the hydroxyl group act as molecular harpoons establishing a network of hydrophobic interactions with I270 and L271 and a hydrogen bond with Q231,

respectively. These interactions could promote the binding orientation of the alkylamino tail in order to interact with R229 or R261 side chains.

Since the carbonyl and amino groups of Q231 and D250 cannot be substituted by performing site directed mutagenesis, their putative involvement in the propafenone-induced block was not further examined. Thus, we focused on the analysis of the relevance of R229 and R261 (Kir2.2 numeration), which are conserved among Kir2.x channels. To this end, these residues were substituted by electrostatically neutral but same-sized residues ( $R \rightarrow Q$ ). Furthermore, we also would have liked to test the effects of their substitution by Ala. Therefore, Kir2.1 mutants constructed and tested were: R228Q, R228A, R260Q, and R260A. Kir2.2 mutants studied were R229A and R229Q. Unfortunately, neither R261A nor R261Q were obtained because the primers folded in a 7 base-hairpin loop, which comprises the mutation. Finally, Kir2.3 mutants R220Q and R252Q were successfully constructed and tested, while R220A and R252A mutants did not generate any current even when they were expressed in the cell membrane (not shown). Nevertheless, all the mutant channels studied (Fig. 9C) generated small currents that exhibited a tendency to rapidly rundown. Thus, experiments were performed at  $140$  mM  $[K^+]_o$ . Additionally, some mutants generated currents that weakly rectified (Fig. 9B) or that did not rectify at all (Fig. 9A). All these features of the mutants underscore the importance of these residues in channel function. Fig. 9A and B demonstrates that propafenone-induced block, at voltages negative and positive to the  $E_K$ , was significantly decreased in Kir2.3 R220Q and R252Q channels. Substitution of the equivalent residues in Kir2.1 channels significantly reduced propafenone-induced block (Fig. 9C). Finally, mutation of R229 in Kir2.2 channels also significantly decreased the blockade. Overall, these results suggested that these two Arg



**Fig. 7.** Molecular model of propafenone within Kir2.2 channels. Results of the blind docking study of propafenone within the full Kir2.2 channel (PDB ID code 3JYC). Ribbon structure of each monomer of Kir2.2 is shown in green, orange, blue and red colors, with propafenone as purple sticks. Longitudinal view (A) and bird's eye view (B) from the cytoplasm of the images showing models of the lowest energy bindings of propafenone to Kir2.2. C and D. Predicted bonds between propafenone and some amino acids located within the cytoplasmic domain. Images correspond to the first (Mode I: binding affinity =  $-6.7$  kcal/mol) (C) and the second (Mode II: binding affinity =  $-6.5$  kcal/mol) (D) of 20 binding modes. Propafenone and residues implicated in the binding are rendered as sticks. Dashed black lines represent hydrogen bonds.

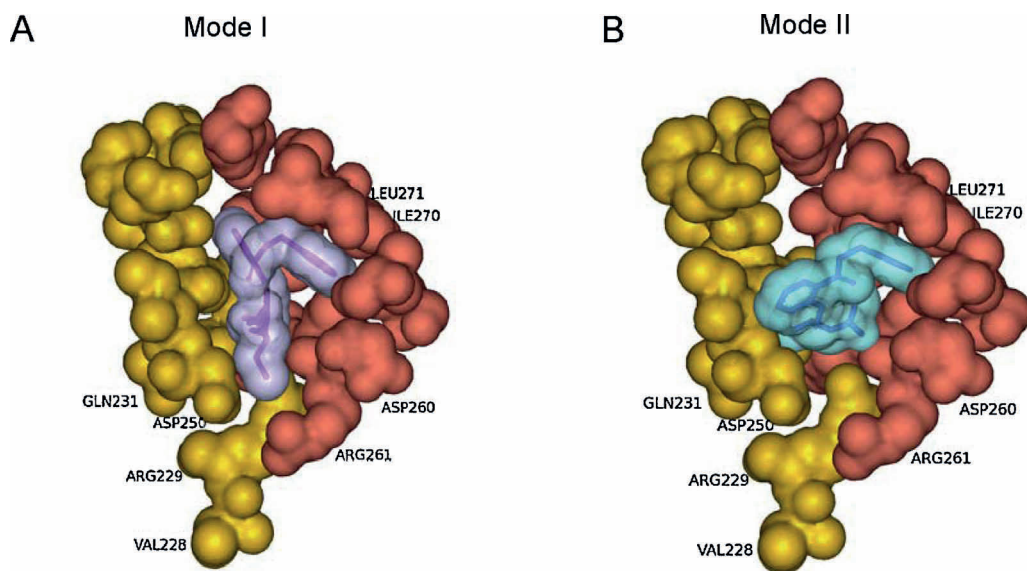
residues were important in determining the propafenone-induced blockade of Kir2.x channels.

#### 4. Discussion

The present results demonstrated that propafenone at concentrations  $>1 \mu\text{M}$  inhibited  $I_{K1}$  generated by Kir2.x homo and heterotetramers by means of a mechanism that, to the best of our knowledge, has never been described before. Analysis of the concentration dependence of the blockade demonstrated that the order of potency was Kir2.3  $>$  Kir2.2  $>$  Kir2.1. Furthermore, propafenone also inhibited human atrial  $I_{K1}$ , the  $\text{IC}_{50}$  for this effect being one order of magnitude higher than the therapeutic

plasma concentrations ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) [16]. Therefore, it seems unlikely that atrial  $I_{K1}$  propafenone inhibitory effect participates in the atrial antiarrhythmic effects of the drug, i.e., cardioversion of recent onset AF ( $5 \mu\text{M}$  propafenone only inhibits atrial  $I_{K1}$  by  $\sim 20\%$ ). Furthermore, since propafenone concentrations needed to inhibit Kir2.1 channels, which probably underlie ventricular  $I_{K1}$ , are even higher, it seems reasonable to propose that Kir2.1 blockade is not the main responsible for the propafenone ventricular proarrhythmic effects.

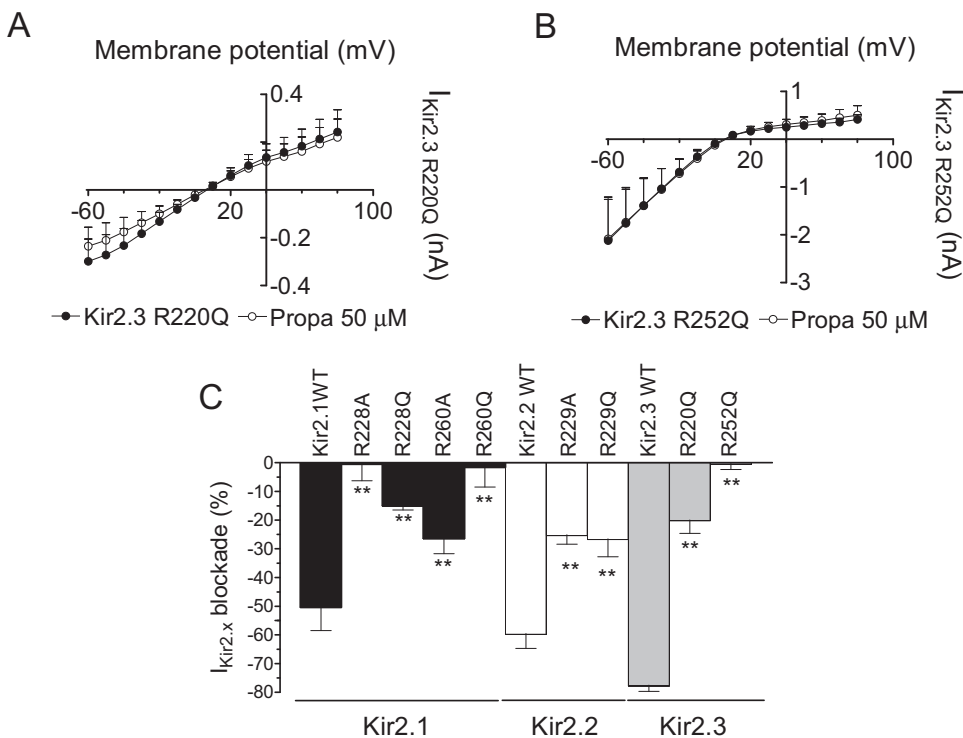
It has been proposed that simultaneous  $I_{K1}$  and  $I_{Na}$  blockade would be the optimal combination for an antifibrillatory drug [27]. Our results demonstrated that propafenone's potency for Kir2.x channels blockade is low and similar to that exhibited by



**Fig. 8.** Predicted binding modes and orientations of propafenone on the cytoplasmic domain of Kir2.2 channels. (A) First (Mode I) (binding affinity =  $-6.7$  kcal/mol) and (B) second (Mode II) (binding affinity =  $-6.5$  kcal/mol) of the most favorable 20 binding modes of propafenone (in purple and blue) on two adjacent subunits of Kir2.2 (yellow and red).

amiodarone ( $IC_{50} = 10\text{--}20\ \mu\text{M}$ ) [28]. Conversely,  $I_{K1}$  is not inhibited by quinidine, disopyramide, procainamide, and flecainide [2,29], which suggests that pharmacological sensitivity of cardiac inward rectifier channels to drugs, that otherwise block many voltage-dependent  $K^+$  channels, is low. Therefore, the finding of an  $I_{K1}$  and  $I_{Na}$  inhibitor remains elusive. However, the importance of the present results does not lie on their therapeutic application but on the fact that they imply the description of a mechanism for ionic channels blockade, which is unusual and unprecedented and that could give new clues for the development of an  $I_{K1}$  inhibitor.

As mentioned, propafenone-induced block showed an inverse correlation to the strength of channel- $PIP_2$  interaction. Moreover, propafenone exhibited a slow inhibition time course that was independent of whether the drug was externally (whole-cell) or internally (excised inside-out) applied. Therefore, the results pointed to an interaction of propafenone with  $PIP_2$  in such a way that it decreased  $PIP_2$  activating effects. In fact, there are previous data suggesting that cationic highly lipophilic drugs such as tamoxifen, mefloquine and carvedilol decrease  $I_{Kir2.x}$  by binding  $PIP_2$  thus preventing its interaction with Kir2.x channels [13–15].



**Fig. 9.** The presence of two Arg residues in the cytoplasmic domain is critical for the propafenone-induced block of Kir2.x channels. *I*-*V* curves for currents recorded in cells expressing R220Q (A) and R252Q (B) Kir2.3 channels in the absence and presence of  $50\ \mu\text{M}$  propafenone. C, Percentage of propafenone-induced block on the current recorded at  $30\ \text{mV}$  negative to  $E_K$  in cells expressing WT or mutant Kir2.x channels.  $^{***}P < 0.01$  vs their respective WT. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $\geq 5$  experiments.

According to this hypothesis, propafenone shifted rightwards the concentration dependence of PIP<sub>2</sub>-increasing effects on Kir2.1 channels, and accelerated the time course of current rundown in inside-out macropatches exposed to neomycin. More innovative were the results obtained when assessing propafenone Kir2.1 blocking effects at the single channel level. As described, in the presence of propafenone sublevels of conductance were apparent. Indeed, in the presence of propafenone amplitude histograms showed peaks corresponding to sublevels with mean amplitudes of  $\approx 1/4$ ,  $\approx 1/2$ , and  $\approx 3/4$  of the fully open level. Thus, the results suggested that propafenone decreased  $I_{\text{Kir}2.x}$  by an uncommon mechanism, i.e., by enhancing the appearance of low conductance channel states. Most channel blockers bind to the pore itself, which physically obstruct the ion flow and/or act by an allosteric mechanism stabilizing closed conformational states of the pore so that opening is less likely [11]. The fact that the propafenone-induced block was irrespective of the  $[K^+]_o$  was the first piece of evidence suggesting that the drug binding site was not located at the pore level. Moreover, it has been described that reducing Kir2.1 channel interaction with PIP<sub>2</sub> by a variety of interventions renders channels that frequently visit subconductance levels [24]. Conversely, the progressive increase of PIP<sub>2</sub>-channel interaction exerts strong positive cooperativity in both converting the channels from the unavailable to the available mode and in promoting the fully open state over sublevels [24].

It has been proposed that polyamines act as cofactors in PIP<sub>2</sub> activation of Kir2.1 channels [26]. Indeed, spermine is able to stabilize the channels in an open configuration, enabling an apparent increase of channel-PIP<sub>2</sub> binding affinity [26]. According to this, we surmised that propafenone-induced block would be greater in channels in which polyamines affinity is decreased by substituting the negatively charged residues that determine polyamine binding located either in the transmembrane or the cytoplasmic pore. Indeed, our results demonstrated that propafenone blockade was significantly higher in D172A, E224A, E299A, and D255R channels than in WT. Therefore, all these results suggested that propafenone inhibited Kir2.x currents by decreasing the PIP<sub>2</sub> activating effects on inward rectifier channels.

However, some results pointed to alternative mechanisms that are not mutually exclusive. First, effects produced by propafenone on L222I Kir2.1 and I213L Kir2.3 channels were identical to those obtained in WT Kir2.1 and Kir2.3 channels, respectively. It was counterintuitive that substitution of the residue that differentiates Kir2.1 and Kir2.3 channels in terms of their PIP<sub>2</sub> channel affinity [4] did not modify propafenone block in the expected direction. Second, and more importantly, the results of the blind docking, thereafter confirmed by site-directed mutagenesis analysis, suggested that the most practical propafenone binding site on Kir2.x channels was not located in the pore lumen but on the interface between subunits comprising positively charged residues (R228 and R260 in Kir2.1 channels). Importantly, charge neutralization of R228 affects channel PIP<sub>2</sub> interaction a result that has been interpreted considering that R228 might form part of a “binding pocket” for PIP<sub>2</sub> [25]. Blind docking results imply that up to four positively charged propafenone molecules (propafenone is a base with a  $pK_a = 9$  that at the physiological pH predominates in its cationic form) could bind to the channel, thus decreasing the net negative charge of the cytoplasmic pore. According to the structures of K<sup>+</sup> channels [22,30], the cytoplasmic pore is outside the electrical field. A negative electrostatic potential in this region is critical in accumulating both K<sup>+</sup> and polyamines from the internal side, which subsequently facilitates their entry into the transmembrane pore upon depolarization [22,30,31]. Therefore, negative

charges in the cytoplasmic pore are critical to enhance both K<sup>+</sup> permeation and rectification [32–35]. It has been extensively demonstrated that the electrostatic negativity provided by residues E224, E299, D255, and D259 determines the binding of polyamines to their low-affinity binding site, and thus, the extent of Kir2.1 inward rectification [22,30,31]. E224 and E299 create a charged ring located at the top of the cytoplasmic pore, whereas the negatively charged ring created by D259 is located below the former and that of D255 much farther below. Additionally, two overlapped positively charged rings composed of R228 and R260 are located between the E244–E299 and D259 rings [30].

Moreover, negative electrostatic potential at and around residue E224 in the cytoplasmic pore is important to ensure a smooth and large conductance of Kir2.1 channels [33]. Indeed, it has been demonstrated that neutralization of the negative charge at position 224 and/or increase in the number of positive charges in this region of the cytoplasmic pore render channels that display open-channel fluctuations and low conductance [32,33,35]. Under these conditions, subconducting states resulted from the collapse of the ion–ion interacting permeation caused by the lack of specific K<sup>+</sup> coordination within the selectivity filter [36] and the channel, therefore, fluctuated between a high conductance state (main open state with K<sup>+</sup> occupancy in the cytoplasmic pore) and a low conductance state (substate, no K<sup>+</sup> occupancy). According to this hypothesis, incorporation of a positive charge at the level of the R228 and R260 rings provided by propafenone would decrease K<sup>+</sup> concentration on the cytoplasmic pore, which in turn, would not supply enough K<sup>+</sup> ions to the transmembrane region avoiding the full coordination of K<sup>+</sup> ions within the selectivity filter. This would explain the occurrence of subconductance levels in the presence of propafenone. Moreover, it also accounted for the fact that decreasing K<sup>+</sup> efflux by decreasing  $[K^+]_i$  significantly increased the propafenone inhibition of outward current.

Furthermore, decrease of the negative electrostatic potential at and around residue E224 produced by propafenone binding would decrease the polyamines concentration in the pore. This would produce two effects simultaneously. First, it would decrease the strength of rectification [4]. Indeed, our results demonstrated that in the presence of propafenone outward Kir2.x currents were small and a linear function of voltage. Second, this would decrease the PIP<sub>2</sub>-channel affinity [26], therefore explaining why maneuvers that decreased PIP<sub>2</sub> availability or the degree of channel-PIP<sub>2</sub> interaction increased propafenone blocking potency.

In conclusion, here we demonstrated that propafenone inhibits the current generated by the three human cardiac Kir2.x isoforms and their combinations by a novel mechanism not described until now with any other drug. We propose that propafenone incorporates into the cytoplasmic domain of the channel in such a way that it decreases the net negative charge sensed by K<sup>+</sup> ions and polyamines which, in turn, promotes the appearance of subconductance levels and the decrease of PIP<sub>2</sub> affinity of the channels.

#### Acknowledgements

We thank Sandra Sacristán and Paloma Vaquero for her invaluable technical assistance. This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación [SAF2011-30088, and SAF2011-30112], Instituto de Salud Carlos III [Red HERACLES RD06/0009, and PI11/01030], Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares [CNIC-13, CNIC-08-2009], Comunidad Autónoma de Madrid (S2012/BMD-2374), and Sociedad Española de Cardiología grants.

## References

- [1] Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:45–54.
- [2] Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, et al. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15631–36.
- [3] de Boer TP, Houtman MJ, Compier M, van der Heyden MA. The mammalian Kir2.x inward rectifier ion channel family: expression pattern and pathophysiology. *Acta Physiol* 2010;199:243–55.
- [4] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010;90:291–366.
- [5] Jalife J. Inward rectifier potassium channels control rotor frequency in ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* 2009;6:S44–8.
- [6] Piao L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of  $I_{K1}$  in the mouse heart is proarrhythmic. *Basic Res Cardiol* 2007;102:416–28.
- [7] Shimizu W, Horie M. Phenotypic manifestations of mutations in genes encoding subunits of cardiac potassium channels. *Circ Res* 2011;109:97–109.
- [8] Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2003;98:137–48.
- [9] Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR, et al. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:472–80.
- [10] Hatem SN, Coulombe A, Balse E. Specificities of atrial electrophysiology: clues to a better understanding of cardiac function and the mechanisms of arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:90–5.
- [11] Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9–33.
- [12] Rodríguez-Menchaca AA, Navarro-Polanco RA, Ferrer-Villada T, Rupp J, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, et al. The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1364–8.
- [13] Ferrer T, Ponce-Balbuena D, López-Izquierdo A, Aréchiga-Figueroa IA, de Boer TP, van der Heyden MA, et al. Carvedilol inhibits Kir2.3 channels by interference with PIP<sub>2</sub>-channel interaction. *Eur J Pharmacol* 2011;668:72–7.
- [14] López-Izquierdo A, Ponce-Balbuena D, Moreno-Galindo EG, Aréchiga-Figueroa IA, Rodríguez-Martínez M, Ferrer T, et al. The antimalarial drug mefloquine inhibits cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> channels: evidence for interference in PIP<sub>2</sub>-channel interaction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57:407–15.
- [15] Ponce-Balbuena D, López-Izquierdo A, Ferrer T, Rodríguez-Menchaca AA, Aréchiga-Figueroa IA, Sánchez-Chapula JA. Tamoxifen inhibits inward rectifier K<sup>+</sup> family of inward rectifier channels by interfering with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-channel interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331:563–73.
- [16] Bryson HM, Palmer KJ, Langtry HD, Fitton A. Propafenone: a reappraisal of its pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drugs* 1993;45:85–130.
- [17] Caballero R, González de la Fuente M, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, et al. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2346–54.
- [18] Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, et al. Nitric oxide increases cardiac  $I_{K1}$  by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;105:383–92.
- [19] Delpón E, Caballero R, Valenzuela C, Longobardo M, Snyders D, Tamargo J. Benzocaine enhances and inhibits the K<sup>+</sup> current through a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 1999;42:510–20.
- [20] Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem* 1983;4:187–217.
- [21] Morreale A, Maseras F, Iriepa I, Gálvez E. Ligand-receptor interaction at the neural nicotinic acetylcholine binding site: a theoretical model. *J Mol Graphics Modell* 2002;21:111–8.
- [22] Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009;326:1668–74.
- [23] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;31:455–61.
- [24] Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008;586:1833–48.
- [25] Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002;34:933–44.
- [26] Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Long polyamines act as cofactors in PIP<sub>2</sub> activation of inward rectifier potassium (Kir2.1) channels. *J Gen Physiol* 2005;126:541–9.
- [27] Pandit SV, Jalife J. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res* 2013;112:849–62.
- [28] Sato R, Koumi S, Singer DH, Hisatome I, Jia H, Eager S, et al. Amiodarone blocks the inward rectifier potassium channel in isolated guinea pig ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:1213–9.
- [29] Iost N, Virág L, Varró A, Papp JG. Comparison of the effect of class IA antiarrhythmic drugs on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;8:31–41.
- [30] Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, et al. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;8:279–87.
- [31] Kurata HT, Cheng WW, Arrabit C, Slesinger PA, Nichols CG. The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of Kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2007;130:145–55.
- [32] Chang HK, Yeh SH, Shieh RC. Charges in the cytoplasmic pore control intrinsic inward rectification and single-channel properties in Kir1.1 and Kir2.1 channels. *J Membr Biol* 2007;215:181–93.
- [33] Fujiwara Y, Kubo Y. Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. *J Gen Physiol* 2006;127:401–19.
- [34] Xie LH, John SA, Weiss JN. Spermine block of the strong inward rectifier potassium channel Kir2.1: dual roles of surface charge screening and pore block. *J Gen Physiol* 2002;120:53–66.
- [35] Yeh SH, Chang HK, Shieh RC. Electrostatics in the cytoplasmic pore produce intrinsic inward rectification in Kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2005;126:551–62.
- [36] Lu T, Wu L, Xiao J, Yang J. Permeant ion-dependent changes in gating of Kir2.1 inward rectifier potassium channels. *J Gen Physiol* 2001;118:509–22.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Table S1.** Patient characteristics.

Patients ( <i>n</i> )	5
Mean age (years)	65±4
Male/Female ( <i>n</i> )	4 (80%) / 1 (20%)
Cardiopathy	
Valvular ( <i>n</i> )	3 (60%)
Ischemic ( <i>n</i> )	1 (20%)
Combined ( <i>n</i> )	1 (20%)
Hypertension ( <i>n</i> )	5 (100%)
Diabetes mellitus ( <i>n</i> )	2 (40%)
Dyslipidemia ( <i>n</i> )	3 (60%)
Ejection fraction (%)	58.8±1.1
NYHA functional class	
I ( <i>n</i> )	1 (20%)
II ( <i>n</i> )	4 (80%)
III ( <i>n</i> )	0 (0%)
IV ( <i>n</i> )	0 (0%)
Creatinine (mg/dL)	0.9±0.2
Pulmonar systolic pressure (mm Hg)	46.3±5.6
Treatment	
ACE inhibitors/ARBs ( <i>n</i> )	4 (80%)
Statins ( <i>n</i> )	3 (60%)
Acetylsalicylic acid ( <i>n</i> )	3 (60%)
Beta blockers ( <i>n</i> )	2 (40%)
Calcium antagonists ( <i>n</i> )	0 (0%)

ACE, angiotensin converting enzyme; ARBs, angiotensin II type 1 receptor blockers; CABG, coronary artery bypass grafting. NYHA: New York Heart Association.





## **IV. DISCUSIÓN**



En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de dos fármacos antiarrítmicos del grupo Ic, flecainida y propafenona, sobre los canales Kir2.x que generan la corriente  $I_{K1}$  cardíaca humana. Asimismo, hemos estudiado los efectos de ambos fármacos sobre la  $I_{K1}$  generada en miocitos auriculares humanos. Los resultados han podido demostrar que ambos fármacos a concentraciones equivalentes a las concentraciones plasmáticas tras la administración de dosis terapéuticas aumentan la  $I_{K1}$  generada por homotetrámeros de canales Kir2.1. Además la propafenona, pero no la flecainida, a concentraciones altas inhibe la corriente generada por canales Kir2.x siendo de más potentes para inhibir la corriente generada por canales Kir2.3.

### 1. Efectos de la flecainida sobre canales Kir2.x

Los resultados demuestran que la flecainida aumenta la  $I_{Kir2.1}$  fundamentalmente por reducir el bloqueo del canal producido por las polimainas intracelulares disminuyendo la afinidad de las mismas por su sitio de unión en el canal. Adicionalmente, la incubación durante al menos 24 horas con flecainida es capaz de aumentar la densidad de canales Kir2.1 expresados en la membrana. Por el contrario, la flecainida no modifica la  $I_{Kir2.2}$  ni la  $I_{Kir2.3}$  ni tampoco aumenta la expresión de canales Kir2.2 o Kir2.3 en la membrana. La selectividad de los efectos de flecainida sobre canales Kir2.1 se debe a la presencia de un residuo Cys311 en el dominio citoplasmático, que en los canales Kir2.2 y Kir2.3 es una Ala.

#### 1.1. La flecainida aumenta la $I_{Kir2.1}$ pero no la $I_{Kir2.2}$ o la $I_{Kir2.3}$

La flecainida aumenta la  $I_{Kir2.1}$  generada por canales tetraméricos Kir2.1. La presencia de subunidades Kir2.2 o Kir2.3 en los canales hace que la flecainida sea incapaz de aumentar la corriente. Por tanto la flecainida aumentará la  $I_{K1}$  nativa en los miocitos de aquellas especies en los que la corriente es generada por homotetrámeros de canales Kir2.1. Nuestros resultados demuestran que la flecainida aumenta la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de cobayo mientras que no modifica la  $I_{K1}$  auricular de cobayo, ni la registrada en miocitos auriculares humanos. Estos datos sugieren que en cobayo la  $I_{K1}$  auricular es generada por heterotetrámeros de canales Kir2.x mientras que en los miocitos ventriculares por homotetrámeros Kir2.1. Diversos datos electrofisiológicos y moleculares sugieren que los canales Kir2.3 son muy abundantes en la aurícula humana (Gaborit y cols., 2007). Por desgracia, por limitaciones éticas no hemos podido disponer de preparaciones ventriculares humanas y no hemos podido corroborar nuestros datos. Sin embargo, los datos moleculares sugieren que los canales Kir2.1

son críticos para generar la  $I_{K1}$  en el ventrículo humano, al igual que en el cobayo. Si esto fuera así, la flecainida, a concentraciones plasmáticas terapéuticas aumentaría la  $I_{K1}$ . Las implicaciones arritmogénicas que tiene este resultado se discutirán más adelante.

Dada una concentración, la flecainida aumenta más la  $I_{Kir2.1}$  generada a potenciales positivos al  $E_K$  que la generada a potenciales negativos del  $E_K$ . Es decir, aumenta más la conductancia de la  $I_{Kir2.1}$  a los potenciales relevantes desde el punto de vista fisiológico. Nuestros resultados demuestran que la flecainida reduce la intensidad de la rectificación de la corriente. La rectificación de la  $I_{Kir2.x}$  (disminución de la conductancia a potenciales positivos al  $E_K$ ) se debe, fundamentalmente, al bloqueo voltaje-dependiente del canal por parte de las poliaminas intracelulares, cargadas positivamente, que con la despolarización, son repelidas del citoplasma penetrando por el poro del canal. Los resultados demuestran que la flecainida disminuye la afinidad del canal por las poliaminas de forma concentración-dependiente. Más aún, los resultados sugieren que se trata de un mecanismo no competitivo, puesto que en presencia de flecainida el efecto máximo producido por la máxima concentración de poliaminas no supera el 82%. Este dato implica que la flecainida no compite con las poliaminas por su sitio de unión en el poro del canal, sino que la unión de flecainida a su propio sitio receptor reduce alostéricamente la afinidad de las poliaminas por sus sitios de unión.

Es sabido que la unión transitoria de las poliaminas a los residuos citoplásmicos Glu224, Asp259, y Glu299 citoplásmico contribuye a la fijación de las poliaminas a su sitio en el poro citoplásmico acelerando el bloqueo (Lu, 2004; Pegan y cols., 2005). Por tanto comprobamos si la mutación de estos residuos disminuía el aumento de la corriente de salida por parte de flecainida. Los resultados confirmaron que la flecainida no modifica la  $I_{Kir2.1}$  generada por los canales E224A, D259A, y E299A, que, por otra parte, y como era de esperar, no rectifica a potenciales positivos. La hipótesis es que la unión de la flecainida a la lámina  $\beta I$  modifica la posición de los anillos de cargas negativas formados por los aminoácidos ácidos del poro citoplasmático antes mencionados de modo que disminuye la afinidad de las poliaminas por estos sitios de unión transitoria (Lu, 2004; Bichet y cols., 2003). Estos resultados son la primera demostración de que un fármaco, utilizado en la terapéutica es capaz de afectar los canales Kir2.1 cardiacos humanos modulando su interacción con las poliaminas.

Nuestros resultados demuestran que la Cys311 localizada en la lámina  $\beta I$  en el dominio citoplasmático C-terminal del canal Kir2.1 determina la unión de la flecainida. De hecho, la ausencia de efectos de la flecainida en canales Kir2.2 y Kir2.3 se explica porque estos canales presentan en la posición equivalente (en una región altamente conservada) un residuo Ala. Las láminas  $\beta I$  y  $\beta H$  forman el denominado lazo HI o lazo G (residuos 300-315) (Pegan y

cols., 2005). Las mutaciones en esta región alteran los mecanismos de apertura y cierre de los canales Kir2.1 (*gating*) así como la rectificación (Pegan y cols., 2005). Por tanto, parece razonable proponer que la unión de la flecainida a esta región produzca los efectos observados. Además el lazo HI es estructuralmente diferente pero está acoplado funcionalmente al sitio de unión del PIP<sub>2</sub>. (Garneau y cols., 2003; Pegan y cols., 2005; Logothetis y cols., 2007). De hecho, el residuo adyacente a la Cys311, la Arg312 (posición en los canales Kir2.1) modula la interacción canal-PIP<sub>2</sub> (Bichet y cols., 2003; Logothetis y cols., 2007). Más aún, se ha demostrado previamente que la sustitución de la Cys311 por residuos polares modifica las propiedades cinéticas de los canales Kir2.1 favoreciendo la aparición de intervalos de larga duración en los que el canal permanece cerrado lo que disminuye la  $P_o$ . Estos efectos fueron atribuidos a una desestabilización de la interacción PIP<sub>2</sub>-canal (Garneau y cols., 2003). Por consiguiente, sospechamos que la interacción de la flecainida con la Cys311 podría aumentar los efectos activadores del canal del PIP<sub>2</sub>. Nuestros resultados demostraron que la flecainida aumenta la  $P_o$  del canal desplazando la curva  $P_o$ -V hacia potenciales más negativos. Más aún, la flecainida no modificó la amplitud de la corriente unitaria, o la conductancia del canal, pero aumentó el tiempo medio de apertura y la  $f_o$ . Todos estos efectos son idénticos a los producidos por el PIP<sub>2</sub> (Logothetis y cols., 2007). Por último, significar que la mutación L222I, que da lugar a canales Kir2.1 funcionales pero con una menor afinidad por el PIP<sub>2</sub> suprime el aumento de la corriente a potenciales negativos sin modificar el aumento que produce la flecainida a potenciales positivos del  $E_K$ .

## 1.2. La flecainida aumenta la densidad de canales Kir2.1 en la membrana.

La incubación de las células transfectadas durante 24 h con flecainida (1  $\mu$ M) aumenta la densidad de canales Kir2.1 en la membrana. Este efecto también depende de la presencia de la Cys311. Si tras la incubación con flecainida ésta se añade de forma aguda, también se observa el aumento de la  $I_{Kir2.1}$ . Es decir, que ambos efectos se suman. Por tanto, la flecainida aumentará la  $I_{K1}$  generada por homotetrámeros de canales Kir2.1 por dos mecanismos simultáneamente. Para comprobar si la flecainida aumenta la corriente generada por canales Kir2.1 con mutaciones responsables de la aparición del SAT, estudiamos sus efectos sobre canales R67W y R218W. Como era de esperar, la perfusión con flecainida no aumenta la corriente generada por estos canales que es extremadamente pequeña puesto que ambos carecen de afinidad por el PIP<sub>2</sub>. Sin embargo la incubación con flecainida durante 24 de células transfectadas aumenta la densidad de canales R67W, pero no la de R218W. También comprobamos que la incubación con flecainida aumenta la densidad de canales L222I. Estos

resultados preliminares sugieren que en pacientes del SAT portadores de mutaciones que generan canales funcionales la flecainida aumentaría la densidad en la membrana tanto de los canales nativos (codificados por el alelo sano) como los mutados. Es decir, que la flecainida produce un “rescate farmacológico” de ciertas mutaciones responsables del SAT.

Existen evidencias previas que demuestran que la densidad en la membrana de algunos canales puede ser modulada farmacológicamente. De hecho, se ha descrito que la incubación con cloroquina o con pentamidina aumenta y disminuye la densidad de canales Kir2.1, respectivamente (de Boer y cols., 2010). Serán necesarios estudios complementarios para identificar si el aumento de la densidad de canales Kir2.1 en la membrana se debe a que ésta aumenta el tráfico anterógrado o, por el contrario, disminuye la endocitosis de la proteína del canal desde la membrana.

## 2. Implicaciones terapéuticas.

La flecainida es un potente bloqueante de los canales de  $\text{Na}^+$  que también bloquea diversos canales de  $\text{K}^+$ . Como se ha mencionado en la introducción la flecainida inhibe las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{Kr}$  a concentraciones similares a las necesarias para inhibir la  $I_{Na}$  (Wang y cols., 1995; Follmer y cols., 1990). La flecainida prolonga de forma dependiente de la frecuencia la DPA y el periodo refractario del tejido auricular humano sin apenas modificar la DPA del tejido ventricular (la flecainida apenas modifica el QT) (Wang y cols., 1990; Katritsis y cols., 1995). El aumento selectivo de la  $I_{K1}$  ventricular (generada por homotetrámeros de canales Kir2.1) puede explicar la diferencia de efectos de flecainida sobre la DPA auricular y ventricular. Dado que la  $I_{K1}$  determina de forma crítica la fase final de repolarización (fase 3) se puede anticipar que el aumento de la  $I_{K1}$  ventricular contrarrestará la prolongación de la DPA producido por el bloqueo de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje. Por el contrario, en el tejido auricular en el cual la flecainida no aumenta la  $I_{K1}$  (generada por heterotetrámeros de Kir2.x), la prolongación de la DPA producida por el bloqueo de canales de  $\text{K}^+$  se hará evidente.

Por otra parte el aumento de la  $I_{K1}$  ventricular podría participar en los efectos proarrítmicos ventriculares de la flecainida. Como se ha mencionado en la introducción diversos estudios han demostrado la importancia de la  $I_{K1}$  en el mantenimiento y la estabilidad de los rotores y en la dinámica de la fibrilación ventricular. La predicción es que el aumento de la  $I_{K1}$  acelera y estabiliza la reentrada de los frentes espirales.

### 3. Efectos de la propafenona sobre canales Kir2.x

Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran que la propafenona, a concentraciones  $>1 \mu\text{M}$ , inhibe la  $I_{K1}$  generada por homo- y heterotetrámeros de canales Kir2.x mediante un mecanismo, que hasta donde sabemos, no ha sido descrito previamente con ningún otro fármaco. El análisis de la dependencia de dosis de los efectos demuestran que la potencia de bloqueo tiene el orden: Kir2.3>Kir2.2>Kir2.1. Más aún, la propafenona también inhibe la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares humanos, siendo la  $CI_{50}$  de este efecto un orden de magnitud mayor que las concentraciones plasmáticas alcanzadas tras la administración de dosis terapéuticas ( $1 \mu\text{M}$ ) (Bryson y cols., 1993). Por tanto parece improbable que la inhibición de la  $I_{K1}$  auricular participe en los efectos antiarrítmicos de la propafenona, esto es en la cardioversión de la fibrilación de reciente comienzo (Propafenona  $5 \mu\text{M}$  sólo inhibe la  $I_{K1}$  en un 20%). Por otra parte, dado que las concentraciones de propafenona necesarias para inhibir la corriente generada por homotetrámeros de Kir2.1, que probablemente generan la  $I_{K1}$ , ventricular son incluso mayores, parece razonable afirmar que el bloqueo de canales Kir2.1 no es responsable de los efectos proarrítmicos ventriculares de la propafenona.

Se ha propuesto que la inhibición simultánea de la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  sería la combinación óptima para un fármaco con propiedades antifibrilatorias (Pandit y Jalife, 2013). Nuestros resultados demuestran que la potencia de la propafenona para bloquear canales Kir2.x es baja, y similar a la exhibida por amiodarona ( $CI_{50} = 10\text{-}20 \mu\text{M}$ ) (Sato y cols., 1994). La quinidina, la disopiramida, y la flecainida, por el contrario no inhiben la  $I_{K1}$  (Iost y cols., 2003). Estos resultados sugieren que la sensibilidad de los canales Kir2.x a los fármacos que bloquean canales de  $K^+$  dependientes de voltaje es baja. Por tanto, parece difícil, de momento, identificar un fármacos que inhiba a concentraciones terapéuticas tanto la  $I_{Na}$  como la  $I_{K1}$  auricular.

El bloqueo de canales Kir2.x muestra una correlación inversa con al afinidad del canal por el  $PIP_2$  (a mayor afinidad menor sensibilidad a la propafenona). El curso temporal de aparición del bloqueo producido por la propafenona es muy lento y es independiente de si el fármaco se aplica por la cara intracelular (en parches escindidos inside-out) o extracelular (en la configuración de célula entera) de la membrana. Estos resultados apuntaban a que la propafenona modulaba la interacción del  $PIP_2$  con el canal disminuyendo sus efectos activadores. De hecho, existen datos previos que demuestran que otros fármacos catiónicos altamente liposolubles como el tamoxifeno, la mefloquina, y el carvedilol disminuyen la  $I_{Kir2.x}$  uniéndose al  $PIP_2$  e impidiendo su interacción con el con los canales Kir2.x (Ferrer y cols.,



2011; López-Izquierdo, 2011; Ponce-Balbuena, 2009). Algunos de los datos experimentales reforzarían esta hipótesis. En primer lugar, la propafenona desplaza hacia la derecha la curva de concentración-respuesta de los efectos activadores del PIP<sub>2</sub> y, en segundo lugar, acelera el curso temporal de la disminución de la corriente producida por neomicina en parches escindidos. La neomicina (un compuesto policationico) interacciona con el PIP<sub>2</sub> (polianiónico) de manera que “secuestra” el PIP<sub>2</sub> impidiendo su interacción con el canal. La aplicación de neomicina en parches escindidos en su cara intracelular produce una disminución gradual de la corriente Kir2.1 hasta abolirse. Por tanto, cuanto más intensa sea la interacción del PIP<sub>2</sub> con el canal más tiempo tarda la neomicina en reducir la corriente  $I_{Kir2.1}$  al 50% de su valor inicial ( $\tau_{50}$ ) (Xie y cols., 2008). En condiciones control la  $\tau_{50}$  era de unos 5 min, mientras que en presencia de propafenona la  $\tau_{50}$  disminuía hasta aproximadamente 1 min. Este resultado sugería que la propafenona disminuía la afinidad del canal por el PIP<sub>2</sub>.

Los resultados demostraron que en presencia de propafenona aparecen subniveles de conductancia. Este dato indica que el fármaco está cambiando de forma radical la conductancia del canal por un mecanismo que no había sido descrito con anterioridad con ningún fármaco estudiado. Efectivamente, en presencia de propafenona los histogramas de amplitud mostraban picos correspondientes a subniveles con amplitudes de  $\approx 1/4$ ,  $\approx 1/2$ ,  $\approx 3/4$  de la conductancia del estado completamente abierto. De estos resultados se deduce que la propafenone disminuye la  $I_{Kir2.x}$  por un mecanismo único: induciendo la aparición de estados de baja conductancia.

La mayor parte de los bloqueantes de canales se unen en algún punto del poro hidrófilo impidiendo el flujo iónico a su través. En otras ocasiones la unión del fármaco induce por un mecanismo alostérico la estabilización de algún estado cerrado de manera que disminuye la probabilidad de apertura del poro. En otras ocasiones se combinan ambos mecanismos (Tamargo y cols., 2004). El hecho de que el bloqueo producido por propafenona fuera independiente de la intensidad del flujo de K<sup>+</sup> a través del poro (que fue variada cambiando la  $[K]_o$ ), fue el primer resultado que sugería que el sitio de unión del fármaco no estaba localizado en el poro del canal. Más aún, se ha descrito previamente que la disminución de la interacción con el PIP<sub>2</sub> de lugar a canales que visitan con frecuencia niveles subconductores (Xie y cols., 2008). Por el contrario, el aumento progresivo de la concentración de PIP<sub>2</sub> produce “cooperatividad positiva” favoreciendo la aparición del estado de máxima conductancia frente a los estados subconductores (Xie y cols., 2008).

Se ha propuesto que las poliaminas actúan como cofactores positivos de la unión del PIP<sub>2</sub> a los canales Kir2.1 (Xie y cols., 2005). De hecho, la espermina (la poliamina más potente) es capaz de estabilizar los canales Kir2.1 en un estado abierto permitiendo un aumento aparente

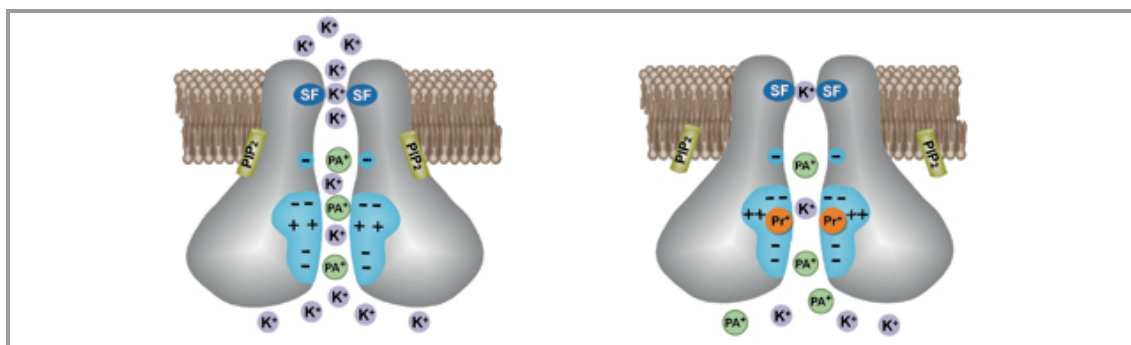
de la afinidad del canal por el PIP<sub>2</sub> (Xie y cols., 2005). De acuerdo con esta hipótesis, el bloqueo de la propafenona debía ser mayor en aquellos canales con poca afinidad por las poliaminas, es decir, en aquellos canales en los que se han mutado los residuos cargados negativamente localizados en el poro citoplasmático o transmembrana (D172) con los que interaccionan las poliaminas. En efecto, los resultados demostraron que el bloqueo producido por la propafenona era significativamente mayor en canales D172A, E224A, E299A, y D255R que en canales Kir2.1 nativos. Por todo lo mencionado anteriormente se podría concluir que el mecanismo por el cual la propafenona inhibía la  $I_{Kir2.x}$  era disminuyendo la afinidad de los canales Kir2.x por su activador endógeno, el PIP<sub>2</sub>.

Sin embargo, había otros datos que sugerían que la anterior propuesta podría ser una versión algo reduccionista de los hechos experimentales y sugerían la existencia de mecanismos alternativos que no tenían por qué ser mutuamente excluyentes.

En primer lugar, los efectos de la propafenone en canales L222I Kir2.1 y I213L Kir2.3 eran idénticos a los producidos en los canales nativos Kir2.1 y Kir2.3, respectivamente. Parece contradecir lo esperado que la sustitución del residuo responsable de la diferencia de afinidad por el PIP<sub>2</sub> de canales Kir2.1 y Kir2.3 (Hibino y cols., 2010) no tuviera un efecto en la dirección esperada en cuanto a modificación del bloqueo. En segundo lugar, y más importante, los experimentos de “docking ciego” sugerían la existencia de un sitio de unión para la propafenona situado en la interfaz entre subunidades contiguas. Es decir, que habría 4 sitios de unión para propafenona por canal, sitios que fueron confirmados mediante experimentos de mutagénesis dirigida. Los sitios de unión no estaban localizados en la luz del poro y estaban determinados de forma crítica por dos aminoácidos cargados positivamente (R228 y R260 en la secuencia de Kir2.1). Estos sitios estaban, por supuesto, conservados en canales Kir2.2 y Kir2.3. Es importante reseñar que se había descrito previamente que la neutralización de la carga R228 disminuye la afinidad del canal Kir2.1 por el PIP<sub>2</sub>, por lo que se consideró que dicho residuo formaba parte del “bolsillo de unión del PIP<sub>2</sub>” (Lopes y cols., 2002). Datos estructurales recientes y nuestros propios resultados, apuntan a que el mecanismo por el cual la desaparición de la carga positiva disminuye la afinidad por el PIP<sub>2</sub> no es porque el PIP<sub>2</sub> se una directamente a dicho residuo (ver más adelante).

Los resultados de “docking ciego” sugieren que al canal se pueden unir hasta cuatro moléculas de propafenona en su forma catiónica (la propafenona es una base débil con un pKa=9, que a pH fisiológico predomina en su forma catiónica) por lo que con su unión disminuyen la “carga neta negativa” del dominio citoplasmático del canal (Figura 37). De acuerdo con lo descrito mediante difracción con rayos X (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009) el poro citoplasmático está fuera del campo eléctrico transmembrana. Por tanto, una

carga neta negativa en esta parte de la proteína es crítica para acumular tanto el  $K^+$  como las poliaminas. Esta acumulación en la cara intracelular facilita su entrada en el poro transmembrana con la despolarización (Pegan y cols., 2005; Kurata y cols., 2007; Tao y cols., 2009). Por tanto, la presencia de cargas negativas en el poro citoplasmático es necesaria para mantener la conductancia y la rectificación (Xie y cols., 2002; Yeh y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Chang y cols., 2007). Se ha demostrado ampliamente que la carga negativa proporcionada por los residuos E224, E299, D255 y D259 determina la unión de las poliaminas a sus sitios de baja afinidad, y, por tanto, el grado de rectificación (Pegan y cols., 2005; Kurata y cols., 2007; Tao y cols., 2009). Los residuos E224 y E299, de las cuatro subunidades (8 residuos en total), forman un anillo de carga negativa localizado en la parte alta del poro citoplasmático, mientras que el anillo creado por los residuos D259 queda por debajo del formado por los residuos D255. A la vez, dos anillos superpuestos de cargas positivas formados por los residuos R228 y R260 quedan en una posición intermedia entre los anillos formados por E224-E229 y D259 (Pegan y cols., 2005). Más aún, el potencial electrostático negativo alrededor del residuo E224 en el poro citoplasmático es indispensable para garantizar una conductancia continua y alta de los canales Kir2.1 (Fujiwara y cols., 2006). De hecho, se ha demostrado que la neutralización de la carga en la posición 224 y/o el aumento del número de cargas positivas en esta región, da lugar a canales que presentan baja conductancia y fluctuaciones en el estado abierto (Yeh y cols., 2005; Fujiwara y cols., 2006; Chang y cols., 2007). En estas condiciones, los subestados de conductancia aparecen como consecuencia del colapso de las interacciones ion-ion y consecuencia, a su vez, de la falta de coordinación de iones  $K^+$  en el filtro de selectividad (Lu y cols., 2001). Al no estar saturados todos los sitios de coordinación con el  $K^+$  en el filtro de selectividad el canal fluctúa entre un estado de alta conductancia, cuando el filtro está ocupado, y otro de baja conductancia (subestado), cuando en el filtro no todos los sitios están ocupados por el  $K^+$  (Lu y cols., 2001). De acuerdo con este modelo, la incorporación de moléculas de propafenona cargadas positivamente a la altura de los anillos formados por R228 y R260, disminuirá la concentración de  $K^+$  en el poro, lo cual, por su parte, hará que el aporte de  $K^+$  hacia el poro transmembrana disminuya, evitando la completa coordinación de iones  $K^+$  con el filtro de selectividad. Esto, explicaría la aparición de subestados de conductancia observados en presencia de propafenona. Más aún, también explicaría el aumento de bloqueo observado al disminuir la salida de  $K^+$  a través del canal producido disminuyendo la  $[K^+]_i$ .



**Figura 37. Representación esquemática del mecanismo propuesto para bloqueo de los canales Kir2.x por propafenona.** Se observa como la presencia de la propafenona cerca del poro citoplasmático disminuye la concentración de iones  $K^+$  y poliaminas en el poro, y la afinidad del canal por el  $PIP_2$ . SF: Filtro de selectividad.  $PA^+$ : poliamina.  $Pr^+$ : propafenona. [Adaptada de Amorós y cols., 2013]

La disminución del potencial electrostático negativo en, y alrededor del residuo E224, producido por la unión de propafenona también disminuiría la concentración de poliaminas en el poro. Esto daría lugar a dos efectos simultáneamente (Figura 37). En primer lugar, disminuirá la intensidad de la rectificación (Hibino y cols., 2010), explicando por qué en presencia de propafenona la corriente de salida a potenciales de membrana positivos la  $E_K$  es pequeña y prácticamente una función lineal del voltaje. Es decir, en presencia de propafenona el canal no rectifica. En segundo lugar, disminuiría la afinidad del canal por el  $PIP_2$ , lo que explicaría por qué las maniobras experimentales que disminuyen la biodisponibilidad del  $PIP_2$  o el grado de interacción  $PIP_2$ -canal aumentaban la potencia de bloqueo de la propafenona.

#### 4. Conclusiones.

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de flecainida y propafenona, dos antiarrítmicos del grupo Ic, sobre los canales Kir2.x que generan la corriente  $I_{K1}$  humana. Los resultados demuestran que la flecainida, a concentraciones terapéuticas, aumenta la corriente ventricular sin modificar la auricular lo cual podría contribuir a sus efectos proarrítmicos. La selectividad de los efectos de la flecainida se debe a que se une a un residuo (Cys311) sólo presente en los canales Kir2.1 (ventriculares) pero no en los Kir2.2 o Kir2.3. La unión de la flecainida disminuye la rectificación de la corriente aumentando la salida de  $K^+$ .

La propafenona por su parte, bloquea a concentraciones supra-terapéuticas los canales Kir2.x siendo más potente para bloquear los Kir2.3 (auriculares) que los Kir2.1 (auriculares). La propafenona se incorpora a sitios específicos de unión en el poro citoplasmático disminuyendo la carga neta negativa percibida por los iones  $K^+$  y las poliaminas lo cual promueve la aparición de estados subconductores y disminuye la afinidad del canal por el  $PIP_2$ .

El mecanismo responsable del aumento y el bloqueo producido por la flecainida y la propafenona, respectivamente, es inédito, lo que le da un gran valor conceptual y permitirá avanzar en el conocimiento de la farmacología de los canales Kir2.x, conocimiento que hasta la fecha está en un estado de desarrollo muy incipiente.

## **V. CONCLUSIONES**



En la presente Tesis Doctoral hemos analizado los efectos de la flecainida y la propafenona sobre los canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 expresados en células CHO y sobre la corriente nativa  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares humanos y en miocitos ventriculares de cobayo. Además hemos realizado modelados moleculares para predecir los sitios de unión más probables de éstos fármacos a la familia de canales Kir2.x, y comprobado la implicación de los mismos en los efectos observados mediante mutagénesis dirigidas. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1) La flecainida, un fármaco antiarrítmico del grupo Ic, a concentraciones plasmáticas terapéuticas, aumenta la  $I_{K1}$  generada por homotetrámeros de canales Kir2.1 pero no modifica la generada por homo o heterotetrámeros en los que participan los canales Kir2.2 y Kir2.3. En consecuencia, la flecainida no modifica la  $I_{K1}$  auricular pero sí aumenta la  $I_{K1}$  ventricular en el corazón de cobayo. Más aún, la flecainida tampoco modifica la  $I_{K1}$  auricular humana.

2) El aumento de la corriente  $I_{Kir2.1}$  se produce como consecuencia de la unión de la flecainida mediante puente de hidrógeno a la Cys311 localizada en la banda  $\beta$ I del dominio citoplasmático del canal.

3) La unión de la flecainida a su sitio receptor disminuye de forma alostérica la afinidad del canal por las poliaminas intracelulares, lo que disminuye la rectificación interna de la corriente, aumentando la salida de  $K^+$  a potenciales positivos al  $E_K$ .

4) La unión de la flecainida aumenta la afinidad del canal por el  $PIP_2$  con lo que aumenta la  $P_o$  del canal a todos los potenciales de membrana.

5) La unión de la flecainida al residuo Cys311 aumenta la expresión de canales Kir2.1 nativos y mutados en la membrana citoplasmática lo que aumenta la densidad de la corriente generada en el caso de que éstos sean funcionales.

6) La propafenona, un fármaco antiarrítmico del grupo Ic, a concentraciones supra-terapéuticas inhibe la  $I_{K1}$  generada por homo- y heterotetrámeros de canales Kir2.x, siendo los canales más sensibles los Kir2.3, seguidos de los Kir2.2, y por último los Kir2.1. La sensibilidad de la  $I_{K1}$  auricular humana es muy similar a la de la  $I_{Kir2.3}$ , lo que confirma el importante papel de los canales Kir2.3 en esta corriente cardíaca.



7) La unión de la propafenona a los canales Kir2.x disminuye su afinidad por el PIP<sub>2</sub>. Este efecto justifica que cuanto menor es la afinidad del canal Kir2.x por el PIP<sub>2</sub> mayor sea su sensibilidad a la propafenona.

8) La propafenona disminuye también la afinidad del canal por las poliaminas intracelulares lo que hace desaparecer la rectificación interna de la corriente.

9) La propafenona se une a las Arg228 y Arg260 (en canales Kir2.1) disminuyendo la carga neta negativa del poro citoplasmático. Esto, a su vez, disminuye la concentración de K<sup>+</sup> y poliaminas en el poro conductor.

10) La disminución de la concentración de K<sup>+</sup> provoca el colapso de las interacciones iónicas, impidiendo la coordinación del K<sup>+</sup> con el filtro de selectividad lo que, a su vez, da lugar a la aparición de estados subconductores.

11) La disminución de la concentración de poliaminas a nivel del poro conductor, abole la rectificación interna y disminuye la afinidad del canal por el PIP<sub>2</sub>.

## **Bibliografia**



- ABBOTT GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms  $I_{Kr}$  potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175–187.
- ABRIEL H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:2–11.
- ACCILI EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. Separable Kv $\beta$  subunit domains alter expression and gating of potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:25824–25831.
- ALBSOUL–YOUNES AM, Sternweis PM, Zhao P, Nakata H, Nakajima S, Nakajima Y, Kozasa T. Interaction sites of the G protein  $\beta$  subunit with brain G protein–coupled inward rectifier K $^{+}$  channel. *J Biol Chem* 2001;**276**:12712–12717.
- ALDRICH RW. Fifty years of inactivation. *Nature* 2001;**411**:643–644.
- ALEKSANDROV A, Velimirovic B, Clapham DE. Inward rectification of the IRK1 K $^{+}$  channel reconstituted in lipid bilayers. *Biophys J* 1996;**70**:2680–2687.
- ALIOT E, Capucci A, Crijns HJ, Goette A, Tamargo J. Twenty–five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace* 2011;**13**:161–173
- ALLESSIE MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circ Res* 1973;**33**:54–62.
- ALLESSIE MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block, as studied with multiple microelectrodes. *Circ Res* 1976;**39**:168–177.
- ALLESSIE MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The ‘leading circle’ concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res* 1977;**41**:9 – 18.
- ALLESSIE MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of Moe’s multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. En: *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. Zipes DP, Jalife J. Orlando: Grune & Stratton 1985:265 – 275.
- ALMERS W. Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules. *J Physiol* 1972;**225**:33–56.
- AMIN AS, Asghari–Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch*. 2010;**460**:223–37.
- AMORÓS I, Jiménez–Jaimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG, Dolz–Gaitón P, Alvarez M, Martínez–Espín E, Lorente JA, Melgares R, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011; **8**:463–70.
- AMORÓS I, Dolz–Gaitón P, Gómez R, Matamoros M, Barana A, de la Fuente MG, Núñez M, Pérez–Hernández M, Moraleda I, Gálvez E, Iriepa I, Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore. *Biochem Pharmacol* 2013;**86**:267–278.
- AMOS GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**491**:31–50.
- AN WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A–type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000;**403**:553–556.
- ANDELFINGER G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL Jr, Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex–specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:663–668.
- ANNO T, HONDEGHEM LM. Interactions of flecainide with guinea pig cardiac sodium channels. Importance of activation unblocking to the voltage dependence of recovery. *Circ Res* 1990;**66**:789–803.
- ANTZELEVITCH C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP Jr, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggreffe M, Wolpert C. Loss–of–function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST–segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007;**115**:442–449.

- ANUMONWO JMB, LOPATIN AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:45–54.
- APKON M, NERBONNE JM. Characterization of two distinct depolarization-activated  $K^+$  currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;**97**:973–1011.
- ARIAS C, González T, Moreno I, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Valenzuela C. Effects of propafenone and its main metabolite, 5-hydroxypropafenone, on HERG channels. *Cardiovasc Res* 2003;**57**:660–669.
- ARMSTRONG CM. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion rejection in squid axons. *J Gen Physiol* 1969;**54**:553–575.
- ARMSTRONG CM, BEZANILLA F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973;**242**:459–461.
- ARMSTRONG CM. Ionic pores, gates and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974;**7**:179–210.
- ARMSTRONG CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981;**61**:644–682.
- BÄHRING R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of  $Kv\beta$  subunits. *J Biol Chem* 2001;**276**:22923–22929.
- BALSER JR, Nuss HB, Romashko DN, Marbán E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996;**107**:643–658.
- BALSER JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:599–613.
- BARANA A, Amorós I, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Blázquez C, Guzmán M, Delpón E, Tamargo J. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res* 2010; **85**:56–67.
- BARHANIN J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G.  $KvLQT1$  and  $IsK$  (minK) proteins associate to form the  $I_{Ks}$  cardiac potassium current. *Nature* 1996;**384**:78–80.
- BARTOLOME J, Hughenard J, Slotkin TA. Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. *Science* 1980;**210**:793–794.
- BARUSCOTTI M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:55–64.
- BAUMGARTEN CM, Isenberg G, McDonald TF, Ten Eick RE. Depletion and accumulation of potassium in the extracellular clefts of cardiac Purkinje fibers during voltage clamp hyperpolarization and depolarization: experiments in sodium-free bathing media. *J Gen Physiol* 1977;**70**:149–169.
- BEAN BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989;**51**:367–384.
- BEAUMONT J, Davidenko N, Davidenko JM, Jalife J. Spiral waves in two-dimensional models of ventricular muscle: formation of a stationary core. *Biophys J* 1998;**75**:1–14.
- BEELEER GW, REUTER H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J Physiol* 1970;**207**:165–190.
- BEELEER GW, REUTER H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977;**268**:177–210.
- BELLOCQ C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the  $KCNQ1$  gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004;**109**:2394–2397.
- BENDAHHOUS S, Donaldson MR, Plaster NM, Tristani-Firouzi M, Fu YH, Ptáček LJ. Defective potassium channel  $Kir2.1$  trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *J Biol Chem* 2003;**278**:51779–51785.
- BENDAHHOUS S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. *In vitro* molecular interactions and distribution of KCNE family with  $KCNQ1$  in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:529–538.
- BERS DM, PÉREZ-REYES E.  $Ca^{2+}$  channels in cardiac myocytes: structure and function in  $Ca^{2+}$  influx and intracellular  $Ca^{2+}$  release. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:339–360.
- BERTASO F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated  $K^+$  channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002;**97**:424–433.

- BEUCKELMANN DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:379–385.
- BEZANILLA F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002;**120**:465–473.
- BIANCHI L, Roy ML, Tagliatalata M, Lundgren DW, Brown AM, Ficker E. Regulation by spermine of native inward rectifier K<sup>+</sup> channels in RBL-1 cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:6114–6121.
- BEZANILLA F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000;**80**:555–592.
- BICHET D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I–II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit. *Neuron* 2000;**25**:177–190.
- BICHET D, Haass FA, Jan LY. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* 2003;**4**:957–967.
- BIDAUD I, Lory P. Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: A focus on the Timothy mutations in Cav1.2 channels. *Biochimie* 2011; **93**:2080–6.
- BIERMANS G, Vereecke J, Carmeliet E. The mechanism of the inactivation of the inward-rectifying K<sup>+</sup> current during hyperpolarizing steps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1987;**410**:604–613.
- BJERREGAARD P, GUSSAK I. Short QT syndrome: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;**2**:84–87.
- BODI I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;**115**:3306–3317.
- BOSCH RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:121–131.
- BOWDITCH H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagern des Herzens ziegen. *Arb Physiol Anstalt* 1871;**6**:139–176.
- BOYETT MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;**319**:1–22.
- BRAUN AP, Fedida D, Giles WR. Activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes. *Pflügers Arch* 1992;**421**:431–439.
- BREHM P, ECKERT R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 1978;**202**:1203–1206.
- BREITWIESER GE, SZABO G. Mechanism of muscarinic receptor-induced K<sup>+</sup> channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988;**91**:469–493.
- BRENDEL J, PEUKERT S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002;**12**:1589–1598.
- BROOKSBY P, Levy AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;**11**:611–622.
- BROWN AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981;**318**:479–500.
- BRUGADA R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004;**109**:30–35.
- BRUNET S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 2004;**559**:103–120.
- BRYSON HM, Palmer KJ, Langtry HD, Fitton A. Propafenone. A reappraisal of its pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drugs* 1993;**45**:85–130.
- BURAEI Z, YANG J. The  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev* 2010; **90**:1461–506.
- BURASHNIKOV E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Häissaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmern S,

- Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010; **7**:1872–82.
- BURASHNIKOV A, Mannava S, Antzelevitch C. Transmembrane action potential heterogeneity in the canine isolated arterially perfused right atrium: effect of  $I_{Kr}$  and  $I_{Kur}/I_{to}$  block. *Am J Physiol* 2004; **286**:H2393–H2400.
- BURNASHEV NA, ZILBERTER YU I. Two types of single inward rectifying potassium channels in rat myocardial cells. *Gen Physiol Biophys* 1986; **5**:495–504.
- CABALLERO R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002; **56**:104–117.
- CABALLERO R, Pourrier M, Schram G, Delpón E, Tamargo J, Nattel S. Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents: voltage dependence and role of S6 valines. *Br J Pharmacol* 2003; **138**:1475–1484.
- CABALLERO R, Gómez R, Moreno I, Núñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res* 2004a; **62**:86–95.
- CABALLERO R, Gómez R, Núñez L, Moreno I, Tamargo J, Delpón E. Diltiazem inhibits hKv1.5 and Kv4.3 currents at therapeutic concentrations. *Cardiovasc Res* 2004b; **64**:457–466.
- CABALLERO R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010a; **55**:2346–2354.
- CABALLERO R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010b; **107**:15631–15636.
- CABO C, Pertsov AM, Davidenko JM, Baxter WT, Gray RA, Jalife J. Vortex shedding as a precursor of turbulent electrical activity in cardiac muscle. *Biophys J* 1996; **70**:1105 – 1111.
- CAHILL SA, GROSS GJ. Propafenone and its metabolites preferentially inhibit IKr in rabbit ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **308**:59–65.
- CALDARERA CM, Orlandini G, Casti A, Moruzzi G. Polyamine and nucleic acid metabolism in myocardial hypertrophy of the overloaded heart. *J Mol Cell Cardiol* 1974; **6**:95–103.
- CALLEJA C, Delgado C, Tamargo J. Effect of propafenone on the electrophysiological properties of sheep ventricular muscle and Purkinje fibres. *Br J Pharmacol Proc Suppl*, 1985; **84**:172P.
- CAMPBELL TJ, VAUGHAN WILLIAMS EM: Voltage- and time-dependent depression of maximum rate of depolarization of guinea-pig ventricular action potentials by two new antiarrhythmic drugs, flecainide and lorcainide. *Cardiovasc Res* 1983; **17**:251–258
- CANNON SC, Brown RH, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium induced failure of inactivation. *Neuron* 1991; **6**:619–626.
- CARMELIET E, VEREECKE J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Sperlakis N, Geiger S. *American Physiological Society* 1979:269–334.
- CARMELIET E, MUBAGWA K. Characterization of the acetylcholine-induced potassium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1986; **371**:219–237.
- CARMELIET E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1987; **408**:18–26.
- CARMELIET E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993; **14** (Supp H):3–13.
- CATTERALL WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; **26**:13–25.
- CATTERALL WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships

- of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a;**57**:397–409.
- CATTERALL WA, Pérez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b;**57**:411–425.
- CENS T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the  $\beta 2$  subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Pflügers Arch* 1996;**431**:771–774.
- CHANG HK, Yeh SH, Shieh RC. Charges in the cytoplasmic pore control intrinsic inward rectification and single-channel properties in Kir1.1 and Kir2.1 channels. *J Membr Biol* 2007;**215**:181–193.
- CHEN Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-López R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;**392**:293–296.
- CHEN H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the  $I_{\text{Ks}}$  pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a;**40**:15–23.
- 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. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b;**299**:251–254.
- CHEN L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackrman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:20990–20995.
- CHO HS, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 2003;**550**:169–180.
- CHOE H, Sackin H, Palmer LG. Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants. *J Gen Physiol* 2000;**115**:391–404.
- CHOE S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:115–121.
- CHOI KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated  $\text{K}^+$  channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:5092–5095.
- CHOI KL, Mossman C, Aube J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of *Shaker* potassium channels. *Neuron* 1993;**10**:533–541.
- CHOUABE C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1  $\text{K}^+$  channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997;**16**:5472–5479.
- CHRISTE G. Localization of  $\text{K}^+$  channels in the tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance,  $I_{\text{K1}}$  and  $I_{\text{K,ATP}}$  during culture and by delayed  $I_{\text{K1}}$  response to barium. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**:2207–2213.
- CHRISTIE MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990;**4**:405–411.
- CLANCY SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ, Slesinger PA. Pertussis-toxin-sensitive  $\text{G}_i$  subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: Evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol Cell Neurosci* 2005;**28**:375–389.
- CLARK RB, Tremblay A, Melnyk P, Allen BG, Giles WR, Fiset C. T-tubule localization of the inward-rectifier  $\text{K}^+$  channel in mouse ventricular myocytes: a role in  $\text{K}^+$  accumulation. *J Physiol* 2001;**537**:979–992.
- CLARKSON CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of  $V_{\text{max}}$  in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984;**247**:H645–H654.
- COETZEE W, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal M, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Sáenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of  $\text{K}^+$  channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**868**:233–285.
- COHEN NA, Brenman JE, Synder SH, Bredt DS. Binding of the inward rectifier  $\text{K}^+$  channel Kir2.3 to PSD-95 regulated by the protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 1996;**17**:759–767.
- COHEN SS. A guide to the polyamines. *Oxford University Press* 1998.



- COLLINS A, LARSON M. Differential sensitivity of inward rectifier K<sup>+</sup> channels to metabolic inhibitors. *J Biol Chem* 2002;**277**:35815–35818.
- CONTI LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001;**276**:41270–41278.
- CORABOEUF E, OTSUKA M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;**234**:441–444.
- CORABOEUF E, CARMELIET E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**392**:352–359.
- CORDEIRO JM, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2009;**46**:695–703.
- CORMIER JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass R. Secondary structure of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel C terminus. Evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;**277**:9233–9241.
- CORTÉS DM, Cuello LG, Perozo E. Molecular architecture of full-length *KcsA*: Role of cytoplasmic domain in ion permeation and activation gating. *J Gen Physiol* 2001;**117**:165–180.
- COULOMBE A, CORABOEUF E. Simulation of potassium accumulation in clefts of Purkinje fibers: effect on membrane electrical activity. *J Theor Biol* 1983;**104**:211–229.
- COURTEMANCHE M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:477–489.
- COVARRUBIAS M, Wei AA, Salkoff L. *Shaker*, *Shal*, *Shab*, and *Shaw* express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 1991;**7**:763–773.
- CRANEFIELD P, ARONSON R. *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*. Cranefield & Aronson. *Futura* 1975.
- CUI J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K<sup>+</sup> channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000;**10**:671–674.
- CURRAN ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:795–803.
- DARBAR D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008;**117**:1927–1935.
- DASCAL N, Schreiber W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10235–10239.
- DAVIDENKO JM, Kent PF, Chialvo DR, Michaels DC, Jalife J. Sustained vortex-like waves in normal isolated ventricular muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:8785–8789.
- De BOER TP, Nalos L, Sary A, Kok B, Houtman MJ, Antoons G, van Veen TA, Beekman JD, de Groot BL, Opthof T, Rook MB, Vos MA, van der Heyden MA. The anti-protozoal drug pentamidine blocks KIR2.x-mediated inward rectifier current by entering the cytoplasmic pore region of the channel. *Br J Pharmacol* 2010;**159**:1532–1541.
- De BRUIN ML, Pettersson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J* 2005;**26**:590–597.
- De WAARD M, Pragnell M, Campbell KP. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* 1994;**13**:495–503.
- DECHER N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yuksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:255–264.
- DECHER N, Renigunta V, Zuzarte M, Soon M, Heinemann SH, Timothy KW, Keating MT, Daut J, Sanguinetti MC, Splawski I. Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: A novel mechanism of Andersen syndrome. *Cardiovasc Res* 2007;**75**:748–757.
- Del CASTILLO J, KATZ B. Production of membrane potential changes in the frog's heart by inhibitory nerve impulses. *Nature* 1955;**175**:1035.

- DELGADO C, Tamargo J, Tejerina T. The electrophysiological effects of propafenone on guinea-pig atrial muscle. *Br J Pharmacol Proc Suppl*, 1984;**81**:171P.
- DELGADO C, Tamargo J, Tejerina T. Electrophysiological effects of propafenone in untreated and propafenone-pretreated guinea-pig atrial and ventricular muscle fibres. *Br J Pharmacol* 1985;**86**:765–775.
- DELGADO C, Tamargo J, Henzel D, Lorente P. Effects of propafenone on calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1993;**108**:721–727.
- DELPÓN E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier  $K^+$  current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;**76**:223–235.
- DELPÓN E, TAMARGO J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerras JAF. McGraw-Hill 2005:450–562.
- DELPÓN E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008a;**1**:209–218.
- DELPÓN E, Cosío FG, Caballero R. Fármacos antiarrítmicos. En: *Farmacología Básica y Clínica / Velázquez*. Lorenzo P, Moreno A, Lizosáin I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. *Médica Panamericana*. 2008b:369–388.
- DENNIS A, Wang L, Wan X, Ficker E. hERG channel trafficking: Novel targets in drug-induced long QT syndrome. *Biochem Soc Trans* 2007;**35**:1060–1063.
- DESCHÊNES I, TOMASELLI GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002;**528**:183–188.
- DESCHÊNES I, Armoundas AA, Jones SP, Tomaselli GF. Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Nav $\beta$ 1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and  $I_{to}$  currents. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:336–346.
- DHAMOON AS, JALIFE J. The inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;**2**:316–324.
- DHAMOON AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier  $K^+$  current. *Circ Res* 2004;**94**:1332–1339.
- Di DIEGO JM, ANTZELEVITCH C. Pinacidil-induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in canine ventricular tissues. Does activation of ATP-regulated potassium current promote phase 2 reentry? *Circulation* 1993;**88**:1177–1189.
- Di DIEGO JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Pérez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 2002; **106**:2004–11.
- DÍAZ RJ, Zobel C, Cho HC, Batthish M, Hinek A, Backx PH, Wilson GJ. Selective inhibition of inward rectifier  $K^+$  channels (Kir2.1 or Kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ Res* 2004;**95**:325–332.
- DiFRANCESCO D, Ferroni A, Visentin S. Barium-induced blockade of the inward rectifier in calf Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1984;**402**:446–453.
- DiFRANCESCO D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 2006;**53**:399–406.
- DILKS D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999;**81**:1974–1977.
- DIXON JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. The role of the Kv4.3  $K^+$  channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;**79**:659–668.
- DOBREV D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:397–404.
- DOBREV D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current  $I_{K,ACH}$  is

- constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:3697–3706.
- DOMENE C, Haider S, Sansom M. Ion channels structures: a review of recent progress. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;**6**:611–619.
- DONALDSON MR, Jensen JL, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Bendahhou S, Suarez WA, Cobo AM, Poza JJ, Behr E, Wagstaff J, Szepietowski P, Pereira S, Mozaffar T, Escolar DM, Fu YH, Ptacek LJ. PIP<sub>2</sub> binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 2003;**60**:1811–1816.
- DORIAN P, Penkoske PA, Witkowski FX. Order in disorder: effect of barium on ventricular fibrillation. *Can J Cardiol* 1996;**12**:399–406.
- DÖRING F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci* 1998;**18**:8625–8636.
- DOYLE DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 1998;**280**:69–77.
- DROLET B, Simard C, Mizoue L, Roden DM. Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drug binding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 2005;**115**:2209–2213.
- DUAN D, Fermini B, Nattel S. Potassium channel blocking properties of propafenone in rabbit atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;**264**:1113–1123.
- DUDEL J, Peper K, Rüdell R, Trautwein W. The potassium component of membrane current in Purkinje fibers. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1967; **296**:308–27.
- DUKES ID, VAUGHAN WILLIAMS, E. The multiple modes of action of propafenone. *Eur J Cardiol* 1984;**5**:115–125.
- EAHOLTZ G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994;**12**:1041–1048.
- ECHT DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med.* 1991;**324**:781–788.
- ECKHARDT LL, Farley AL, Rodríguez E, Ruwaldt K, Hammill D, Tester DJ, Ackerman MJ, Makielski JC. KCNJ2 mutations in arrhythmia patients referred for LQT testing: a mutation T305A with novel effect on rectification properties. *Heart Rhythm* 2007;**4**:323–329.
- ENGLAND SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:6309–6313.
- FAKLER B, Braendle U, Bond C, Glowatzki E, König C, Adelman JP, Zenner HP, Ruppersberg JP. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* 1994;**356**:199–203.
- FAKLER B, Braendle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 1995;**80**:149–154.
- FAKLER B, Bond CT, Adelman JP, Ruppersberg JP. Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels from subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10). *Pflügers Arch* 1996a;**433**:77–83.
- FAKLER B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppersberg JP. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J* 1996b;**15**:4093–4099.
- FAN Z, MAKIELSKI JC. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:5388–5395.
- FAST VG, KLÉBER AG. Cardiac tissue geometry as a determinant of unidirectional conduction block: assessment of microscopic excitation spread by optical mapping in patterned cell cultures and in a computer model. *Cardiovasc Res* 1995;**29**:697–707.
- FAUCONNIER J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of I<sub>K1</sub> in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res* 2005;**68**:204–212.

- FEDIDA D, Braun AP, Giles WR.  $\alpha_1$ -Adrenoceptors reduce background  $K^+$  current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1991;**441**:673–684.
- FEDIDA D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned  $K^+$  channel current. *Circ Res* 1993;**73**:210–216.
- FENG J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier  $K^+$  current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997;**80**:572–579.
- FENG J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a;**275**:H1717–H1725.
- FENG J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b;**83**:541–551.
- FERMINI B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Difference in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1747–H1754.
- FERRER T, Ponce-Balbuena D, López-Izquierdo A, Aréchiga-Figueroa IA, de Boer TP, van der Heyden MA, Sánchez-Chapula JA. Carvedilol inhibits Kir2.3 channels by interference with PIP<sub>2</sub>-channel interaction. *Eur J Pharmacol* 2011;**668**:72–77.
- FICKER E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier  $K^+$  channels. *Science* 1994;**266**:1068–1072.
- FINLEY MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol* 2002;**283**:H126–H138.
- FOLLMER CH, COLATSKY TJ. Block of delayed rectifier potassium current, IK, by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes. *Circulation* 1990;**82**:289–293.
- FOLLMER CH, Cullinan CA, Colatsky TJ. Differential block of cardiac delayed rectifier current by class Ic antiarrhythmic drugs: evidence for open channel block and unblock. *Cardiovasc Res* 1992;**26**:1121–1130.
- FOZZARD HA, Hiraoka M. The positive dynamic current and its inactivation properties in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1973; **234**:569–86.
- FOZZARD HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985;**56**:475–485.
- FOZZARD HA, Hanck DA, Makielski JC, Stanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987;**43**:1162–1168.
- FRANQUEZA L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997;**81**:1053–1064.
- FRANQUEZA L, Valenzuela C, Delpón E, Longobardo M, Caballero R, Tamargo J. Effects of propafenone and 5-hydroxy-propafenone on hKv1.5 channels. *Br J Pharmacol* 1998;**125**:969–978.
- FUJIWARA Y, KUBO Y. Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. *J Gen Physiol* 2006;**127**:401–419.
- FURUKAWA T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 1992;**70**:91–103.
- FURUKAWA T, Bassett AL, Furukawa N, Kimura S, Myerburg RJ. The ionic mechanism of reperfusion-induced early afterdepolarizations in feline left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 1993;**91**:1521–1531.
- FUSTER V, Rydén LE, Cannom DS, Crijs HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial

- fibrillation: full text: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace* 2006;**8**:651–745.
- GARREY W. The nature of fibrillary contraction of the heart: its relation to tissue mass and form. *Am J Physiol* 1914;**33**:397–414.
- GABORIT N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;**582**:675–693.
- GARNEAU L, Klein H, Parent L, Sauvé R. Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.1 inward rectifier. *Biophys J* 2003;**84**:3717–3729.
- GELBAND H, Bush HL, Rosen MR, Myerburg RJ, Hoffman BF. Electrophysiologic properties of isolated preparations of human atrial myocardium. *Circ Res.* 1972;**30**:293–300.
- GEORGE AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005;**125**:1990–1999.
- GETTES LS, REUTER H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol* 1974;**240**:703–724.
- GILES WR, IMAIZUMI Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988;**405**:123–145.
- GINTANT GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984;**45**:509–512.
- GIUDICISSI JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV, Albertson RM, Antzelevitch C, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Transient outward current ( $I_{to}$ ) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2011; **8**:1024–32.
- GÖGELEIN H. Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulfonylurea drugs. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;**2**:72–80.
- GOLDIN AL. Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel. *J Exp Biol* 2002;**205**:575–584.
- GOLDMAN DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943;**27**:37–60.
- GÓMEZ R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid, block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:146–161.
- GÓMEZ R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009; **105**:383–92.
- GÓMEZ-LAGUNAS F, ARMSTRONG CM. Inactivation in *ShakerB* K<sup>+</sup> channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J* 1995;**68**:89–95.
- GONZÁLEZ DE LA FUENTE M, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. Chronic atrial fibrillation up-regulates  $\beta$ 1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovasc Res* 2013;**97**:379–388.
- GONZÁLEZ T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C. Assembly with the Kv $\beta$ 1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1456–1463.
- GOROSTIZA P, Guarner V, Cárdenas M, Valenzuela F. Effects of  $\alpha$ -adrenergic stimulation on time independent potassium current of isolated ventricular myocytes. *Life Sci* 1995;**56**:1407–1414.
- GRAMMER JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:626–633.
- GRANT AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002;**110**:1201–1209.
- GRAY RA, Jalife J, Panfilov AV, Baxter WT, Cabo C, Davidenko JM, Pertsov AM. Mechanisms of cardiac fibrillation. *Science* 1995;**270**:1222–1223.

- GRAY RA, Pertsov AM, Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature* 1998;**392**:75–78.
- GROVER GJ, GARLID KD. ATP-Sensitive potassium channels: A review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:677–695.
- GULBIS JM, Mann S, MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunit. *Cell* 1999;**97**:943–952.
- GRZEDA KR, Anumonwo JM, O'Connell R, Jalife J. A single-cell model of phase-driven control of ventricular fibrillation frequency. *Biophys J* 2009;**96**:2961–2976.
- GULBIS JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. Structure of the cytoplasmic  $\beta$  subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Science* 2000;**289**:123–127.
- GUSSAK I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 2000;**94**:99–102.
- GUTMAN GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:473–508.
- HAGIWARA N, Irisawa H, Kameyama M. Contributions of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**359**:233–253.
- HALL AE, Hutter OF, Noble D. Current-voltage relations in Purkinje fibres in sodium-deficient solutions. *J Physiol* 1963;**166**:225–240.
- HANCOX JC, Mitcheson JS. Inhibition of L-type calcium current by propafenone in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Br J Pharmacol* 1997;**121**:7–14.
- HANCOX JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native “rapid” delayed rectifier K<sup>+</sup> current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998;**436**:843–853.
- HANSEN SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP<sub>2</sub> activation of the classical inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2. *Nature*. 2011;**477**:495–498.
- HASSINEN M, Paajanen V, Vornanen M. A novel inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir2.5, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2008;**211**:2162–2171.
- HAVERKAMP W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000;**47**:219–233.
- HE M, Bodi I, Mikala G, Schwartz A. Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and electrophysiological study. *J Biol Chem* 1997;**272**:2629–2633.
- HEDIN KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permits GIRK1 expression of I<sub>K,ACh</sub> currents in oocytes. *Neuron* 1996;**16**:423–429.
- HEGINBOTHAM L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J* 1994;**66**:1061–1067.
- HEINEMANN SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;**356**:441–443.
- HERING S, Aczel S, Grabner M, Doring F, Berjukow S, Mitterdorfer J, Sinnegger MJ, Striessnig J, Degtiar VE, Wang Z, Glossmann H. Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. *J Biol Chem* 1996;**271**:24471–24475.
- HERRERA D, Mamarbachi A, Simoes M, Parent L, Sauvé R, Wang Z, Nattel S. A single residue in the S6 transmembrane domain governs the differential flecainide sensitivity of voltage-gated potassium channels. *Mol Pharmacol* 2005;**68**:305–316.
- HIBINO H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010;**90**:291–366.
- HILGEMANN DW, BALL R. Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* 1996;**273**:956–959.

- HILGEMANN DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP<sub>2</sub> with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001;**2001**:RE19.
- HILGEMANN DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* 1997;**59**:193–220.
- HILLE B. *Ion channels of excitable membranes*. Hille B. *Sinauer* 2001.
- HIRAOKA M, KAWANO S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989;**410**:187–212.
- HIRSCHBERG B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 1995;**106**:1053–1068.
- HO K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993;**362**:31–38.
- HOCKERMAN GH, Johnson BD, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1995;**270**:22119–22122.
- HOCKERMAN GH, Johnson BD, Abbott M, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the  $\alpha$ 1 subunit. *J Biol Chem* 1997;**272**:18759–18765.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952a;**116**:473–496.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF. A quantitative description of membrane current and its application to induction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952b;**117**:500–544.
- HODGKIN AL, KATZ B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949;**108**:37–77.
- HOFFMAN B, CRANFIELD P. *Electrophysiology of the heart*. Hoffman B, Cranfield P. *McGraw-Hill* 1960.
- HOFHERR A, Fakler B, Klöcker N. Selective Golgi export of Kir2.1 controls the stoichiometry of functional Kir2.x channel heteromers. *J Cell Sci* 2005;**118**:1935–1943.
- HOFMANN F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994;**17**:399–418.
- HOLMES B, HEEL RC. Flecainide. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1985;**29**:1–33.
- HONDEGHEM LM, KATZUNG BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977;**472**:373–398.
- HONDEGHEM LM. Validity of  $V_{max}$  as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978;**23**:147–152.
- HORIE M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1987;**387**:251–272.
- HORN R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981;**291**:426–427.
- HOSHI T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990; **250**:533–8.
- HOSHI T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in *Shaker* K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxyterminal region. *Neuron* 1991;**7**:547–556.
- HUANG CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of G $\beta$ g to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation. *Neuron* 1995;**15**:1133–1143.
- HUANG CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by G $\beta$ . *Nature* 1998;**391**:803–806.
- HUANG B, Qin D, El-Sherif N. Early down-regulation of K<sup>+</sup> channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:1252–1261.
- HUGHES BA, Kumar G, Yuan Y, Swaminathan A, Yan D, Sharma A, Plumley L, Yang-Feng TL, Swaroop A. Cloning and functional expression of human retinal Kir2.4, a pH-sensitive inwardly

- rectifying  $K^+$  channel. *Am J Physiol* 2000;**279**:C771–C784.
- HUTTER OF, TRAUTWEIN W. Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. *J Gen Physiol* 1955;**39**:715–733.
- HUTTER OF, NOBLE D. Rectifying properties of cardiac muscle. *Nature* 1960;**188**:495.
- INANOBE A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inageda K, Kurachi Y. Inwardly rectifier  $K^+$  channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol* 2002;**282**:C1396–C1403.
- INOMATA N, Ohno T, Ishihara T, Akaike N. Antiarrhythmic agents act differently on the activation phase of the ACh–response in guinea-pig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 1993;**108**:111–115.
- IOST N, Virág L, Varró A, Papp JG. Comparison of the effect of class IA antiarrhythmic drugs on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;**8**:31–41.
- IRISAWA G, HAGIWARA N. Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. En: *Electrophysiology of Sinoatrial and Atrioventricular Nodes*. Mazgalev T, Dreifus L, Michelson E, Alan R. *Liss Alan R Inc* 1988:33–52.
- ISACOFF E, Jan Y, Jan L. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker  $K^+$  channel. *Nature* 1991;**353**:86–90.
- ISENBERG G, KLOCKNER U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 1982;**395**:30–41.
- ISHIHARA K. Time-dependent outward currents through the inward rectifier potassium channel IRK1. The role of weak blocking effects. *J Gen Physiol* 1997;**109**:229–243.
- ISHIHARA K, EHARA T. A repolarization-induced transient increase in the outward current of the inward rectifier  $K^+$  channel in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 1998;**510**:755–771.
- ISOM LL, CATTERALL WA.  $Na^+$  channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996;**383**:307–308.
- ITO H, Takikawa R, Kurachi Y, Sugimoto T. Anti-cholinergic effect of verapamil on the muscarinic acetylcholine receptor-gated  $K_1$  channel in isolated guinea-pig atrial myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989;**339**:244–246.
- ITO H, Vereecke J, Carmeliet E. Intracellular protons inhibit inward rectifier  $K^+$  channel of guinea-pig ventricular cell membrane. *Pflügers Arch* 1992;**422**:280–286.
- IVANINA T, Varon D, Peleg S, Rishal I, Porozov Y, Dessauer CW, Keren–Raifman T, Dascal N.  $G_{i1}$  and  $G_{i3}$  differentially interact with, and regulate, the G protein-activated  $K^+$  channel. *J Biol Chem* 2004;**279**:17260–17268.
- JALIFE J, GRAY R. Drifting vortices of electrical waves underlie ventricular fibrillation in the rabbit heart. *Acta Physiol Scand* 1996;**157**:123–131.
- JALIFE J, Berenfeld O, Skanes A, Mandapati R. Mechanisms of atrial fibrillation: mother rotors or multiple daughter wavelets, or both? *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:S2 – S12.
- JALIFE J, PANDIT SV. Ionic mechanisms of wavebreak in fibrillation. *Heart Rhythm* 2005;**2**:660 – 663.
- JALIFE J. Inward rectifier potassium channels control rotor frequency in ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* 2009;**6**:S44–S48.
- JALIFE J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res* 2011;**89**:766–775.
- JAN LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the Shaker locus in Drosophila. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; **48**:233–45.
- JANGSANGTHONG W, Kuzmenkina E, Khan IF, Matthes J, Hullin R, Herzig S. Inactivation of L-type calcium channels is determined by the length of the N terminus of mutant beta(1) subunits. *Pflügers Arch*. 2010;**459**:399–411.
- JERNG HH, Qian Y, Plaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 2004;**87**:2380–2396.
- JESPERSEN T, Grønnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005;**20**:408–416.



- JI S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:1324–1328.
- JIANG M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K<sup>+</sup> currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res* 2000;**48**:34–43.
- JIANG Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a;**417**:515–522.
- JIANG Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b;**417**:523–526.
- JIANG M, Zhang M, Tang DG, Clemo HF, Liu J, Holwitt D, Kasirajan V, Pond AL, Wettwer E, Tseng GN. KCNE2 protein is expressed in ventricles of different species, and changes in its expression contribute to electrical remodeling in diseased hearts. *Circulation* 2004; **109**:1783–8.
- JOHN SA, Xie LH, Weiss JN. Mechanism of inward rectification in Kir channels. *J Gen Physiol* 2004;**123**:623–625.
- JONES E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac I<sub>Kr</sub> channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004;**279**:44690–44694.
- JOSEPHSON IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984;**54**:157–162.
- JURKIEWICZ NK, SANGUINETTI MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res* 1993;**72**:75–83.
- KÄÄB S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;**98**:1383–1393.
- KANG MG, CAMPBELL KP.  $\gamma$  subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003;**278**:21315–21318.
- KAPRIELIAN R, Wickenden AD, Kassiri A, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999;**517**:229–245.
- KASS RS, SANGUINETTI MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984;**84**:705–726.
- KASS RS, MOSS AJ. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003;**112**:810–815.
- KATRITSIS D, Rowland E, O'Nunain S, Shakespeare CF, Poloniecki J, Camm AJ. Effect of flecainide on atrial and ventricular refractoriness and conduction in patients with normal left ventricle. Implications for possible antiarrhythmic and proarrhythmic mechanisms. *Eur Heart J* 1995;**16**:1930–1935.
- KATZ B. Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949;**2**:285–299.
- KENNEDY ME, Nemeč J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K<sup>+</sup> channel subunits. *Neuropharmacol* 1996;**35**:831–839.
- KENYON JL, GIBBONS WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;**73**:139–157.
- KIM J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 2004a;**41**:745–754.
- KIN Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001;**129**:289–295.
- KLEIMAN RB, HOUSER SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;**256**:H1450–H1461.
- KLINE R, MORAD M. Potassium efflux and accumulation in heart muscle. Evidence from K<sup>+</sup> electrode experiments. *Biophys J* 1976;**16**:367–372.
- KLINE RP, Cohen I, Falk R, Kupersmith J. Activity-dependent extracellular K<sup>+</sup> fluctuations in canine Purkinje fibres. *Nature* 1980;**286**:68–71.

- KLOCKNER U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996;**271**:22293–22296.
- KOCH SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of  $\text{Ca}^{2+}$  channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000;**275**:34493–34500.
- KOHLHARDT M, SEIFERT C. Inhibition of  $V_{\text{max}}$  of the action potential by propafenone and its voltage-time and pH-dependence in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol* 1980;**315**:55–62.
- KOHLHARDT M, Seifert C, Hondeghem LM. Tonic and Phasic/Na blockade by antiarrhythmics. Different properties of drug binding to fast sodium channels as judged from  $V_{\text{max}}$  studies with propafenone and derivatives in mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch* 1983;**396**:199–209.
- KOHLHARDT M. Block of sodium currents by antiarrhythmic agents: analysis of the electrophysiologic effects of propafenone in heart muscle. *Am J Cardiol* 1984;**54**:13D–19D.
- KOHLHARDT M, FICHTNER H. Block of single cardiac  $\text{Na}^+$  channels by antiarrhythmic drugs: the effect of amiodarone, propafenone and diprafenone. *J Membr Biol* 1988;**102**:105–119.
- KOKUBUN S, Nishimura M, Noma A, Irisawa H. Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cell. *Pflugers Arch* 1982;**393**:15–22.
- KOMUKAI K, Brette F, Pascarel C, Orchard CH. Electrophysiological response of rat ventricular myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002a;**283**:H412–H422.
- KOMUKAI K, Brette F, Orchard CH. Electrophysiological response of rat atrial myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002b;**283**:H715–H724.
- KONG W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding  $I_{\text{to}}$ : further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998;**275**:H1963–H1970.
- KOUMI S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic  $\text{K}^+$  channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994;**90**:2213–2224.
- KOUMI S, Backer CL, Arentzen CE. Characterization of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995a;**92**:164–174.
- KOUMI S, Wasserstrom JA, Ten Eick RE.  $\beta$ -Adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier  $\text{K}^+$  channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricle. *J Physiol* 1995b;**486**:661–678.
- KRAPIVINSKY G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial  $\text{K}_1$  channel  $I_{\text{K,ACH}}$  is a heteromultimer of two inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel protein. *Nature* 1995;**374**:135–141.
- KREUSCH A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature* 1998;**392**:945–948.
- KRINSKY VI. Spread of excitation in an inhomogeneous medium (state similar to cardiac fibrillation) *Biophys J* 1966;**11**:776–784.
- KUBO Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993a;**362**:127–133.
- KUBO Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993b;**364**:802–806.
- KUBO Y, MURATA Y. Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1  $\text{K}^+$  channel. *J Physiol* 2001;**531**:645–660.
- KUBO Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:509–526.
- KUO HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the  $\text{Kv}$  channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of  $I_{\text{to}}$  and confers

- susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;**107**:801–813.
- KUO A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimer J, Curhbertson J, Ascroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003;**300**:1922–1926.
- KUO A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Venien–Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005;**13**:1463–1472.
- KUPERSHMIDT S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999;**84**:146–152.
- KURACHI Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic K<sup>+</sup> channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987a;**410**:227–233.
- KURATA HT, Phillips LR, Rose T, Loussouarn G, Herlitz S, Fritzenschaft H, Enkvetchakul D, Nichols CG, Baukowitz T. Molecular basis of inward rectification: polyamine interaction sites located by combined channel and ligand mutagenesis. *J Gen Physiol* 2004;**124**:541–554.
- KURATA HT, FEDIDA D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:185–208.
- KURATA HT, Marton LJ, Nichols CG. The polyamine binding site in inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 2006;**127**:467–480.
- KURATA HT, Cheng WW, Arrabit C, Slesinger PA, Nichols CG. The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of Kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2007;**130**:145–155.
- KUROKAWA J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current  $I_{Ks}$  in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:873–882.
- KURYSHEV YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol* 2000b;**278**:C931–C941.
- KVAM DC, Banitt EH, Schmid JR. Antiarrhythmic and electrophysiologic actions of flecainide in animal models. *Am J Cardiol* 1984;**53**:22–25B.
- KWAK YG, Hu N, Wei J, George AL Jr, Grobaski TD, Tamkun MM, Murray KT. Protein kinase A phosphorylation alters Kv $\beta$ 1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 1999;**274**:13928–13932.
- LAURITA KR, Girouard SD, Rosenbaum DS. Modulation of ventricular repolarization by a premature stimulus. Role of epicardial dispersion of repolarization kinetics demonstrated by optical mapping of the intact guinea pig heart. *Circ Res* 1996;**79**:493–503.
- LEDDA F, Mantelli L, Manzini S, Amerini S, Mugelli A. Electrophysiological and antiarrhythmic properties of propafenone in isolated cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* 1981;**3**:1162–1173.
- LEE KS, Marbán E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985;**364**:395–411.
- LEE TE, Philipson LH, Nelson DJ. N-type inactivation in the mammalian Shaker K<sup>+</sup> channel Kv1.4. *J Membrane Biol* 1996;**151**:225–235.
- LEE MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith–Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997;**15**:181–185.
- LEE JK, John SA, Weiss JN. Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1. *J Gen Physiol* 1999;**113**:555–564.
- LEENHARDT A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* 1995;**91**:1512–1519.
- LEONOUDAKIS D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001;**114**:987–998.
- LEONOUDAKIS D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LMM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR 3<sup>rd</sup>, Vandenberg CA. Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 2004;**279**:22331–22346.

- LESAGE F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, an ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO Journal* 1996;**15**:1004–1011.
- LESAGE F, LAZDUNSKI M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol* 2000;**279**:F793–F801.
- LEWIS T. Oliver. Sharpey lectures on the nature of flutter and fibrillation of the auricle. *Br Med J* 1921;**1**:590–593.
- LI GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a;**78**:689–696.
- LI GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b;**78**:903–915.
- LI D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000;**101**:2631–2638.
- LI J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic up-regulation of I<sub>K1</sub> in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol* 2004;**287**:H2790–H2802.
- LI HL, Qu YJ, Lu YC, Bondarenko VE, Wang S, Skerrett IM, Morales MJ. DPP10 is an inactivation modulatory protein of Kv4.3 and Kv1.4. *Am J Physiol* 2006;**291**:C966–C976.
- LI R, DONG MQ. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Adv Pharmacol* 2010; **59**:93–134.
- LIMAN ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1991;**353**:752–756.
- LIP GY, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet* 2012;**379**:648–661.
- LIPP P, Huser J, Pott L, Niggli E. Spatially non-uniform Ca<sup>2+</sup> signals induced by the reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *J Physiol* 1996;**497**:589–597.
- LITOVSKY SH, ANTZELEVITCH C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;**62**:116–126.
- LIU GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seebohm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001;**532**:115–126.
- LIU WJ, Wang HT, Chen WW, Deng JX, Jiang Y, Liu J. Co-expression of KCNE2 and KChIP2c modulates the electrophysiological properties of Kv4.2 current in COS-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008; **29**:653–60.
- LOEWI O. Über Humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 1921;**189**:239–242.
- LOEWI O, NAVARATIL E. Übertragbarkeit der Herznevenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffes. *Pflügers Arch* 1926;**214**:678–688.
- LOGOTHETIS DE, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch* 2007;**455**:83–95.
- LOMAX AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol* 2003;**285**:H1837–H1848.
- LONDON B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Roberson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1997;**81**:870–878.
- LONG SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 2005a;**309**:897–903.
- LONG SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b;**309**:903–908.
- LOPATIN AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;**372**:366–369.

- LOPATIN AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: “long-pore plugging” by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol* 1995;**106**:923–955.
- LOPATIN AN, Shantz LM, Mackintosh CA, Nichols CG, Pegg AE. Modulation of potassium channels in the hearts of transgenic and mutant mice with altered polyamine biosynthesis. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:2007–2024.
- LOPATIN AN, NICHOLS CG. Inward rectifiers in the heart: an update on  $I_{K1}$ . *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:625–638.
- LOPES CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002;**34**:933–944.
- LOPES CM, Remon JI, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP<sub>2</sub>-sensitivity of K<sup>+</sup> channels. *Channels* 2007;**1**:124–134.
- LÓPEZ-BARNEO J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Recept Channels* 1993;**1**:61–71.
- LÓPEZ-IZQUIERDO A, Ponce-Balbuena D, Moreno-Galindo EG, Aréchiga-Figueroa IA, Rodríguez-Martínez M, Ferrer T, Rodríguez-Menchaca AA, Sánchez-Chapula JA. The antimalarial drug mefloquine inhibits cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> channels: evidence for interference in PIP<sub>2</sub>-channel interaction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;**57**:407–415.
- LU Z, MacKINNON R. Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1994;**371**:243–246.
- LU T, Zhu YG, Yang J. Cytoplasmic amino and carboxyl domains form a wide intracellular vestibule in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:9926–9931.
- LU T, Ting AY, Mainland J, Jan LY, Schultz PG, Yang J. Probing ion permeation and gating in a K<sup>+</sup> channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci* 2001;**4**:239–246.
- LU Z. Mechanism of rectification in inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Annu Rev Physiol* 2004;**66**:103–129.
- LUE WM, BOYDEN PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. *Circulation* 1992;**85**:1175–1188.
- LUNDBY A, OLESEN SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:958–967.
- LUNDQUIST AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL Jr. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of  $I_{Ks}$ . *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:277–287.
- MA D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 2001;**291**:316–319.
- MacKINNON R, YELLEN G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* 1990;**250**:276–279.
- MacKINNON R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;**350**:232–235.
- MacKINNON R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 1993;**262**:757–759.
- MAISEL WH, STEVENSON LW. Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 2003;**91**:2D–8D.
- MAKHINA EN, Kelly AJ, Lopatin AN, Mercer RW, Nichols CG. Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel. *J Biol Chem* 1994;**269**:20468–20474.
- MAKIELSKI JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of  $\beta 1$  with cardiac sodium channel  $\alpha$  subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:30–39.
- MANSOUR M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001;**103**:2631–2636.
- MANTEGAZZA M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:15348–15353.

- MARK MD, HERLITZE S. G-protein mediated gating of inward-rectifier  $K^+$  channels. *Eur J Biochem* 2000;**267**:5830–5836.
- MARTENS JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of  $K_v$  channel  $\alpha/\beta$  subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999;**9**:253–258.
- MARTIN RL, Koumi S, Ten Eick RE. Comparison of the effects of internal  $[Mg^{2+}]$  on  $I_{K1}$  in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**:673–691.
- MARX SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, and Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for  $\beta$  adrenergic receptor modulation of the KCNQ1–KCNE1 potassium channel. *Science* 2002;**295**:496–499.
- MASCHER D, PEPER K. Two components of inward current in myocardial muscle fibers. *Pflügers Arch* 1969;**307**:190–203.
- MATSUDA H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal  $Mg^{2+}$ . *Nature* 1987;**325**:156–159.
- MATSUDA H. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 1988;**397**:237–258.
- MATSUDA H, CRUZ JdS. Voltage-dependent block by internal  $Ca^{2+}$  ions of inwardly rectifying  $K^+$  channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1993;**470**:295–311.
- MAUGHAN DW. Potassium movement during hyperpolarization of cardiac muscle. *J Memb Biol* 1976;**28**:241–262.
- MAYER A. Rhythmical Pulsation in Scyphomedusae. Washington, DC: Carnegie Institute of Washington; 1906. Publication number 47, p1–62.
- McALLISTER RE, NOBLE D. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1966;**186**:632–662.
- McCORMACK T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of *Shaker*  $\beta$ -subunits on the human lymphocyte  $K^+$  channel  $K_v1.3$ . *J Biol Chem* 1999;**274**:20123–20126.
- McCROSSAN ZA, ABBOTT GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;**47**:787–821.
- McDONALD TW, Yu Z, Ming Z, Palm E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SAN, Fishman GI. A minK–HERG complex regulates the cardiac potassium current  $I_{Kr}$ . *Nature* 1997;**388**:289–292.
- McINTOSH MA, Cobbe SM, Kane KA, Rankin AC. Action potential prolongation and potassium currents in left ventricular myocytes isolated from hypertrophied rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**:43–53.
- McLERIE M, LOPATIN A. Dominant-negative suppression of  $I_{K1}$  in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:367–378.
- MELNYK P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol* 2002;**283**:H1123–H1133.
- MERGENTHALER J, Haverkamp W, Hüttenhofer A, Skryabin BV, Musshoff U, Borggreffe M, Speckmann EJ, Breithardt G, Madeja M. Blocking effects of the antiarrhythmic drug propafenone on the HERG potassium channel. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;**363**:472–480.
- MESZAROS J, Ryder KO, Hart G. Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996;**271**:H2360–H2368.
- MIAKE J, Marbán E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 2002;**419**:132–133.
- MIAKE J, Marbán E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest* 2003;**111**:1529–1536.
- MICHAEL G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009; **81**:491–499.
- MIKALA G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type  $Ca^{2+}$  channel pore. *FEBS Lett* 1993;**335**:265–269.

- MIKALA G, Klockner U, Varadi M, Eisfeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998;**185**:95–109.
- MINES GR. On dynamic equilibrium in the heart. *J Physiol* 1913;**46**:349–383.
- MINES G. On circulating excitations in heart muscles and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Trans R Soc Can* 1914;**4**:43–52.
- MITARAI S, Reed TD, Yatani A. Changes in ionic currents and  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in hypertrophied myocytes overexpressing  $G\alpha_q$ . *Am J Physiol* 2000;**279**:H139–H148.
- MITCHESON JS, Hancox JC, Levi AJ. Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflügers Arch* 1996;**431**:814–827.
- MITCHESON JS, SANGUINETTI MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:201–216.
- MITCHESON JS, Chen J, Lin M, Culbertson C, Sanguinetti M. A structural basis for drug induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:12329–12333.
- MITRA R, MORAD M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5340–5344.
- MIYASAKA Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006;**114**:119–125.
- MOE GK, ABILDSKOV JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J* 1959;**58**:59–70.
- MOE GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964;**67**:200–220.
- MORAIS-CABRAL JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the  $K^+$  selectivity filter. *Nature* 2001;**414**:37–42.
- MOREAU C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M, SUR, ABC proteins targeted by  $K_{ATP}$  channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:951–963.
- MORGAN K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP.  $\beta_3$ : An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:2308–2313.
- MORI Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996;**72**:83–109.
- MORISHIGE K, Takahashi N, Findlay I, Koyama H, Zanelli JS, Peterson C, Jenkins NA, Copeland NG, Mori N, Kurachi Y. Molecular cloning, functional expression and localization of an inward rectifier potassium channel in the mouse brain. *FEBS Lett* 1993;**336**:375–380.
- MORISHIGE K, Takahashi N, Jahangir A, Yamada M, Koyama H, Zanelli JS, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific inward rectifier potassium channel. *FEBS Lett* 1994;**346**:251–256.
- MOTOIKE HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The  $Na^+$  channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004;**123**:155–165.
- MUBAGWA R, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of non ischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;**5**:659–671.
- MÜLLER-EHMSEN J, Nábauer M, Schwinger RHG.  $Na^+$ -channel modulating effect of the inotropic compound S(-)-BDF 9196 in human myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;**359**:60–64.
- MUNK AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from rabbit atrioventricular node. *J Physiol* 1996;**493**:801–818.
- MUÑOZ V, Vaidyanathan R, Tolkacheva EG, Dharmoon AS, Taffet SM, Anumonwo JM. Kir2.3 isoform confers pH sensitivity to heteromeric Kir2.1/Kir2.3 channels in HEK293 cells. *Heart Rhythm* 2007;**4**:487–496.
- MURAMATSU H, Sato R, Okumura H. Early increase in  $K^+$  conductance during metabolic inhibition by cyanide in guinea pig ventricular myocytes. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1990;**57**:308–321.

- NÄBAUER M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:386–394.
- NÄBAUER M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168–177.
- NÄBAUER M, KÄÄB S. Potassium channel downregulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;**37**:324–334.
- NADAL MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type  $K^+$  channels. *Neuron* 2003;**37**:449–461.
- NAKAMURA TY, Artman M, Rudy B, Coetzee WA. Inhibition of rat ventricular  $I_{K1}$  with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol* 1998;**274**:H892–H900.
- NARAYAN SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2012;**23**:447–454.
- NATTEL S, SINGH BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999;**84**:11R–19R.
- NATTEL S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:217–226.
- NATTEL S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219–226.
- NATTEL S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion-channel mRNA-expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:96–105.
- NEHRING RB, Wischmeyer E, Döring F, Veh RW, Sheng M, Karschin A. Neuronal inwardly rectifying  $K^+$  channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J Neurosci* 2000;**20**:156–162.
- NERBONNE JM. Molecular basis of functional voltage-gated  $K^+$  channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;**525**:285–298.
- NERBONNE JM, KASS RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205–1253.
- NERNST W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z Phys Chem* 1888;613–637.
- NICHOLS CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996;**78**:1–7.
- NILIUS B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;**316**:443–446.
- NISHIDA M, MacKINNON R. Structural basis of inward rectification. Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002;**111**:957–965.
- NISHIDA M, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J* 2007;**26**:4005–4015.
- NIWA N, NERBONNE JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:12–25.
- NOBLE D. Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward-going (anomalous) rectification. *J Cell Comp Physiol* 1965;**66**:127–136.
- NOBLE D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984;**353**:1–50.
- NODA M, Suzuki H, Huma S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxotoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 1989;**259**:213–216.
- NOMA A, TRAUTWEIN W. Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* 1978;**377**:193–200.
- NOUJAIM SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J. Up-regulation of the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007;**578**:315–326.



- NYGREN A, GILES WR. Mathematical simulation of slowing of cardiac conduction velocity by elevated extracellular  $K^+$ . *Ann Biomed Eng* 2000;**28**:951–957.
- O'CONNELL AD, Morton MJ, Hunter M. Two-pore domain  $K^+$  channels—molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1566**:152–161.
- O'REILLY JP, Wang SY, Kallen RG, Wang GK. Comparison of slow inactivation in human heart and skeletal muscle  $Na^+$  channel chimaeras. *J Physiol* 1999;**515**:61–73.
- OGIELSKA EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of  $K^+$  channels. *Biophys J* 1995;**69**:2449–2457.
- OLIVA C, Cohen IS, Pennefather P. The mechanism of rectification of  $iK_1$  in canine Purkinje myocytes. *J Gen Physiol* 1990;**96**:299–318.
- OLSON TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A.  $Kv1.5$  channelopathy due to  $KCNA5$  loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:2185–2191.
- OSTERRIEDER W, Yang QF, Trautwein W. The time course of the muscarinic response to ionophoretic acetylcholine application to the S-A node of the rabbit heart. *Pflügers Arch* 1981;**389**:283–291.
- OUDIT GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:851–872.
- OXFORD GS, YEH JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985;**85**:583–602.
- PANAMA BK, LOPATIN AN. Differential polyamine sensitivity in inwardly rectifying  $Kir2$  potassium channels. *J Physiol* 2006;**571**:287–302.
- PANAMA BK, McLerie M, Lopatin AN. Heterogeneity of  $I_{K1}$  in the mouse heart. *Am J Physiol* 2007;**293**:H3558–H3567.
- PANDIT SV, Berenfeld O, Anumonwo JM, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J* 2005;**88**:3806–3821.
- PANDIT SV, JALIFE J. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res* 2013;**112**:849–862.
- PANYI G, Sheng Z, Tu L, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated  $K^+$  channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995;**69**:896–903.
- PAPAZIAN DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991;**349**:305–310.
- PATEL AJ, HONORÉ E. Properties and modulation of mammalian 2P domain  $K^+$  channels. *Trends Neurosci* 2001;**24**:339–346.
- PATEL SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on  $Kv4.3$  inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002;**545**:5–11.
- PATEL SP, CAMPBELL DL. Transient outward potassium current,  $I_{to}$ , phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 2005; **569**:7–39.
- PATLAK J, ORTIZ M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985;**86**:89–104.
- PAUL AA, Witchel HJ, Hancox JC. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by flecainide and comparison with quinidine, propafenone and lignocaine. *Br J Pharmacol* 2002;**136**:717–729.
- PEGAN S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of  $Kir2.1$  and  $Kir3.1$  show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;**8**:279–287.
- PEGAN S, Arrabit C, Slesinger PA, Choe S. Andersen's syndrome mutation effects on the structure and assembly of the cytoplasmic domains of  $Kir2.1$ . *Biochemistry* 2006;**45**:8599–8606.
- PELLEG A, BELARDINELLI L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:54–61.

- PEREON Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol* 2000;**278**:H1908–H1915.
- PÉREZ–GARCÍA MT, López–López JR, González C. Kv $\beta$ 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to Kv4.2 but not to *Shaker* channels. *J Gen Physiol* 1999;**113**:897–907.
- PÉREZ–REYES E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-Type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117–161.
- PÉRIER R, Radecke CM, Vandenberg CA. Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:6240–6244.
- PEROZO E. New structural perspectives on K<sup>+</sup> channel gating. *Structure* 2002;**10**:1027–1029.
- PERTSOV AM, Khramov RN, Panfilov AV. Sharp increase in refractory period induced by oxidation suppression in Fitz Hugh–Nagumo model. New mechanism of antiarrhythmic drug action. *Biofizika* 1981;**26**:1077–1081.
- PERTSOV AM, Biktashev VN, Ermakova EA, Krinskii VI. A possibility of significant lowering the defibrillation current by determining the right time for application of a defibrillating pulse. A mathematical model. *Biofizika* 1990;**35**:500–503.
- PERTSOV AM, Davidenko JM, Salomonsz R, Baxter WT, Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1993;**72**:631–650.
- PETERSON BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* 2000;**78**:1906–1920.
- PIAO L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Cardiac I<sub>K1</sub> underlies early action potential shortening during hypoxia in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 2007a;**43**:27–38.
- PIAO L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of I<sub>K1</sub> in the mouse heart is proarrhythmic. *Basic Res Cardiol* 2007b;**102**:416–428.
- PINTO JM, BOYDEN PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K<sup>+</sup> current density in arrhythmogenic subendocardial Purkinje myocytes from the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:299–311.
- PIOLETTI M, Findeisen F, Hura GL, Minor DL Jr. Three-dimensional structure of the KChIP1–Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat Struct Mol Biol* 2006;**13**:987–95.
- PLASTER NM, Tawil R, Tristani–Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen’s Syndrome. *Cell* 2001;**105**:511–519.
- POGWIDZ SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium–calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001;**88**:1159–1167.
- PONCE–BALBUENA D, López–Izquierdo A, Ferrer T, Rodríguez–Menchaca AA, Aréchiga–Figueroa IA, Sánchez–Chapula JA. Tamoxifen inhibits inward rectifier K<sup>+</sup> 2.x family of inward rectifier channels by interfering with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate–channel interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;**331**:563–573.
- POND AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I<sub>Kr</sub> channels. *J Biol Chem* 2000;**275**:5997–6006.
- POSTEMA PG, Ritsema van Eck HJ, Opthof T, van Herpen G, van Dessel PF, Priori SG, Wolpert C, Borggrete M, Kors JA, Wilde AA. I<sub>K1</sub> modulates the U-wave: insights in a 100-year-old enigma. *Heart Rhythm* 2009;**6**:393–400.
- POSTMA AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002;**91**:e21–e26.
- POTREAU D, Gómez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 1995;**30**:440–448.
- PRAGNELL M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel  $\beta$

- subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha 1$  subunit. *Nature* 1994;**368**:67–70.
- PREISIG-MÜLLER R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:7774–7779.
- PRIORI SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimoni L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;**106**:69–74.
- PRIORI SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;**96**:800–807.
- PU J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of  $K_{ATP}$  channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001;**80**:863–868.
- QIN D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, el-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res* 1996; **79**:461–73.
- QU Z, Yang Z, Cui N, Zhu G, Liu C, Xu H, Chanchevalap S, Shen W, Wu J, Li Y, Jiang C. Gating of inward rectifier  $K^+$  channels by proton-mediated interactions of N- and C-terminal domains. *J Biol Chem* 2000;**275**:31573–31580.
- RAAB-GRAHAM KF, Radeke CM, Vandenberg CA. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *NeuroReport* 1994;**5**:2501–2505.
- RADICKE S, Cotella D, Graf EM, Ravens U, Wettwer E. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative  $\beta$ -subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* 2005;**565**:751–756.
- RADICKE S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varro A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current  $I_{to}$  by KCNE  $\beta$ -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:695–703.
- RADICKE S, Cotella D, Bortoluzzi A, Ravens U, Sblattero D, Wettwer E. DPP10 – A new putative regulatory  $\beta$  subunit of  $I_{to}$  in failing and non-failing human heart. *Circulation* 2007;**116**:II.187 (abstract).
- RADICKE S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6  $\beta$ -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774–786.
- RAJAMANI S, Anderson CL, Anson BD, January CT. Pharmacological rescue of human  $K^+$  channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* 2002;**105**:2830–2835.
- RASMUSSEN RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL, Strauss HC. C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac  $K^+$  channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1995; **489**:709–21.
- RASMUSSEN RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of voltage-gated cardiac  $K^+$  channels. *Circ Res* 1998;**82**:739–750.
- REDFERN WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:32–45.
- REUTER H. Divalent cations as change carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973;**26**:1–43.
- ROBERTS R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:9–21.
- RODEN DM, WOOSLEY RL. Drug therapy. Flecainide. *N Engl J Med* 1986;**315**:36–41
- ROHACS T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. Distinct specificities of inwardly rectifying  $K^+$  channels for phosphoinositides. *J Biol Chem* 1999;**274**:36065–36072.
- ROHACS T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. Specificity of activation

- by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:745–750.
- ROSATI B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;**533**:119–125.
- ROUGIER O, Vassort G, Stampfli R. Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1968;**301**:91–108.
- ROUX B, MacKINNON R. The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999;**285**:100–102.
- ROZANSKI GJ, Xu J, Whitney RT, Murakami H, Zucker IH. Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing. *J Mol Cell Cardiol* 1997;**29**:721–732.
- RUDY B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978;**283**:1–21.
- RUIZ-PETRICH E, de Lorenzi F, Chartier D. Role of the inward rectifier  $I_{K1}$  in the myocardial response to hypoxia. *Cardiovasc Res* 1991;**25**:17–26.
- RUPPERSBERG JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990;**345**:475–476.
- SAIKAWA T, CARMELIET E. Slow recovery of the maximal rate of rise ( $V_{max}$ ) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**394**:90–93.
- SAKMANN B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983;**303**:250–253.
- SAKMANN B, TRUBE G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1984a;**347**:641–657.
- SAKMANN B, TRUBE G. Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in guinea-pig heart cell membrane. *J Physiol* 1984b;**347**:659–683.
- SALAMA G, MORAD M. Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart. *Science* 1976;**191**:485–487.
- SAMIE FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216–1223.
- SANGUINETTI M, JURKIEWICZ N. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;**96**:195–215.
- SANGUINETTI M, JURKIEWICZ N. Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;**260**:H393–H399.
- SANGUINETTI M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299–307.
- SANGUINETTI MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K<sup>+</sup> channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a;**93**:2208–2212.
- SANGUINETTI MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac  $I_{Ks}$  potassium channel. *Nature* 1996b;**384**:80–83.
- SANGUINETTI M, SALATA J. Cardiac potassium channel modulators: potential for antiarrhythmic therapy. En: *Potassium channels and their modulators. From synthesis to clinical experience*. Evans J, Hamilton T, Longman S, Stemp G. Taylor & Francis Ltd. 1996:221–256.
- SANGUINETTI M, TRISTANI-FIROUZI M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006;**440**:463–469.
- SANGUINETTI MC. HERG1 channelopathies. *Pflügers Arch* 2010;**460**:265–76.
- SATO R, Koumi S, Singer DH, Hisatome I, Jia H, Eager S, Wasserstrom JA. Amiodarone blocks the inward rectifier potassium channel in isolated guinea pig ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;**269**:1213–1219.
- SCAMPS F, Undrovinas A, Vassort G. Inhibition of I<sub>Ca</sub> in single frog cardiac cells by quinidine,

- flecainide, ethmozin, and ethacizin. *Am J Physiol* 1989;**256**:C549–559.
- SCHERER D, Kiesecker C, Kulzer M, Gunth M, Scholz EP, Kathöfer S, Thomas D, Maurer M, Kreuzer J, Bauer A, Katus HA, Karle CA, Zitron E. Activation of inwardly rectifying Kir2.x potassium channels by  $\beta_3$ -adrenoceptors is mediated via different signalling pathways with a predominant role of PKC for Kir2.1 and of PKA for Kir2.2. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007;**375**:311–322.
- SCHMITT N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000;**19**:332–340.
- SCHOPPA NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science* 1992;**255**:1712–1715.
- SCHOTT JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;**23**:20–21.
- SCHRAM G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939–950.
- SCHRAM G, Pourrier M, Wang Z, White M, Nattel S. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Circ Res* 2003;**59**:328–338.
- SCHULTE U, Hahn H, Wiesinger H, Ruppertsberg JP, Fakler B. pH-dependent gating of ROMK (Kir1.1) channels involves conformational changes in both N and C termini. *J Biol Chem* 1998;**273**:34575–34579.
- SCHULZE-BAHR E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997;**17**:267–268.
- SCHULZE-BAHR E. Short QT syndrome or Andersen syndrome: yin and yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ Res* 2005;**96**:703–704.
- SCHUSTER A, Lacinova L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 1996;**15**:2365–2370.
- SCHWARTZ PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000;**343**:262–267.
- SCULPTOREANU A, Rotman E, Takahashi M, Scheuer T, Catterall WA. Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel  $\alpha_1$  subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10135–10139.
- SEILER N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. En: *Neuropharmacology of polyamines*. Carter C (Eds.). Academic Press;1994:1–30.
- SEINO S, MIKI T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;**81**:133–176.
- SEJERSTED OM, SJOGAARD G. Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 2000;**80**:1411–1481.
- SEKAR RB, Kizana E, Cho HC, Molitoris JM, Hesketh GG, Eaton BP, Marbán E, Tung L.  $I_{K1}$  heterogeneity affects genesis and stability of spiral waves in cardiac myocyte monolayers. *Circ Res* 2009;**104**:355–364.
- SEKI A, Hagiwara N, Kasanuki H. Effects of propafenone on K currents in human atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 1999;**126**:1153–1162.
- SHAH AK, Cohen IS, Dwyer NB. Background  $K^+$  current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes. *Biophys J* 1987;**52**:519–525.
- SHEN NV, PFAFFINGER PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated  $K^+$  channel subunit proteins. *Neuron* 1995;**14**:625–633.
- SHEN W, KURACHI Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;**70**:274–291.

- SHIBATA EF, Drury T, Refsun H, Aldrerte V, Giles WR. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989;**257**:H1773–H1781.
- SHIEH RC. Mechanisms for the time-dependent decay of inward currents through cloned Kir2.1 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 2000;**526**:241–252.
- SHIMIZU W, Kurita T, Matsuo K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Towbin JA, Shimomura K. Improvement of repolarization abnormalities by a K<sup>+</sup> channel opener in the LQT1 form of congenital long QT syndrome. *Circulation* 1998;**97**:1581–1588.
- SHIN HG, LU Z. Mechanism of the voltage sensitivity of IRK1 inward-rectifier K<sup>+</sup> channel block by the polyamine spermine. *J Gen Physiol* 2005;**125**:413–426.
- SHINAGAWA Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K<sup>+</sup> current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 2000;**523**:593–605.
- SHYNG SL, Sha Q, Ferrigni T, Ipatin AN, Nichols CG. Depletion of intracellular polyamines relieves inward rectification of potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12014–12019.
- SHYNG SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of PIP<sub>2</sub> regulation of inward rectifier K<sub>ATP</sub> channels. *J Gen Physiol* 2000;**116**:599–608.
- SIEGELBAUM SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977;**269**:611–613.
- SIGWORTH FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994;**27**:1–40.
- SIMARD C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K<sup>+</sup> channel gene KCNA5. *Clin Pharmacol Ther* 2005;**77**:138–144.
- SINGARAYAR S, Bursill J, Wyse K, Bauskin A, Wu W, Vandenberg J, Breit S, Campbell T. Extracellular acidosis modulates drug block of Kv4.3 currents by flecainide and quinidine. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:641–650.
- SKANES A. Vagally mediated stabilization: the latest spin on rotors in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1473–1474.
- SMITH PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996;**379**:833–836.
- SNYDERS DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;**101**:513–543.
- SNYDERS DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:377–390.
- SOKOLOVA O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001;**9**:215–220.
- SPACH MS, Dolber PC, Anderson PA. Multiple regional differences in cellular properties that regulate repolarization and contraction in the right atrium of adult and newborn dogs. *Circ Res* 1989a;**65**:1594–15611.
- SPACH MS, Dolber PC, Heidlage JF. Interaction of inhomogeneities of repolarization with anisotropic propagation in dog atria. A mechanism for both preventing and initiating reentry. *Circ Res* 1989b;**65**:1612–1631.
- SPECTOR PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanosulfonanilides. *Circ Res* 1996a;**78**:499–503.
- SPECTOR PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I<sub>Kr</sub> channel. *J Gen Physiol* 1996b;**107**:611–619.
- SPLAWSKI I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori SG, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;**102**:1178–1185.
- SPLAWSKI I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004;**119**:19–31.

- STANDEN NB, STANFIELD PR. Potassium depletion and sodium block of potassium currents under hyperpolarization in frog sartorius muscle. *J Physiol* 1979;**294**:497–520.
- STANFIELD PR, Davies NW, Shelton PA, Sutcliffe MJ, Khan IA, Brammar WJ, Conley EC. A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by  $Mg^{2+}$  of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol* 1994;**478**:1–6.
- STANFIELD PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier  $K^+$  channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002;**145**:47–179.
- STEWART S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med* 2002;**113**:359–364.
- STOCKKLAUSNER C, Ludwig J, Ruppersberg JP, Klöcker N. A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier  $K(+)$  channels. *FEBS Lett*. 2001;**493**:129–133.
- STOCKKLAUSNER C, KLOCKER N. Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J Biol Chem*. 2003;**278**:17000–17005.
- STÜHMER W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989;**339**:597–603.
- TABEREAUX PB, Dossall DJ, Ideker RE. Mechanisms of VF maintenance: wandering wavelets, mother rotors, or foci. *Heart Rhythm* 2009;**6**:405–415.
- TAKAHASHI N, Morishige K, Jahangir A, Yamada M, Findlay I, Koyama H, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem* 1994;**269**:23274–23279.
- TAMARGO J, Valenzuela C, Delpón E. New insights into the pharmacology of sodium channel blockers. *Eur Heart J* 1992;**13** Suppl F:2–13.
- TAMARGO J. Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000;**83**:1–19.
- TAMARGO J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9–33.
- TAMARGO J, VALENZUELA C. Fármacos antiarrítmicos. En: *Farmacología Humana*. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Elsevier Masson*. 2008:749–770.
- TAMARGO J, Caballero R, Gómez R, Delpón E.  $I_{Kur}/Kv1.5$  channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399–416.
- TAMARGO J, Caballero R, Delpón, E. Fármacos antiarrítmicos. En: *Cardiomecum*. Guindo J, Bertomeu V, González-Juanatey JR. *Publicaciones Permanyer*. 2011; **20**: 223–246.
- TAMARGO J, Capucci A, Mabo P. Safety of flecainide. *Drug Safety* 2012;**35**:1–17
- TAN HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001;**409**:1043–1047.
- TAO X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier  $K^+$  channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009; **326**:1668–74.
- TERLAU H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;**293**:93–96.
- TERZIC A, Vivaudou M, Moreau C, Olson TM, Jahangir A, Zingman LV, Alekseev AE. Channelopathies of cardiac inwardly rectifying potassium channels. En: *Electrical diseases of the heart: genetics, mechanisms, treatment, prevention*. Gussak I, Antzelevitch C. *Springer-Verlag* 2008:207–217.
- TESTER DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC, Ackerman MJ. Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing. *Heart Rhythm* 2006;**3**:800–805.
- TIKHONOV DB, ZHOROV BS. Homology modeling of Kv1.5 channel block by cationic and electroneutral ligands. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1838**:978–987.

- TOMASELLI GF, MARBÁN E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:270–283.
- TOMBOLA F, Pathak MM, Isacoff EY. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 2005;**48**:719–725.
- TÖPERT C, Döring F, Wischmeyer E, Karschin C, Brockhaus J, Ballanyi K, Derst C, Karschin A. Kir2.4: a novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci* 1998;**18**:4096–4105.
- TRAUTWEIN W, DUDEL J. Zum mechanismus der membranwirkung descetylcholines an der Herzmuskelfaser. *Pflügers Arch* 1958;**266**:324–334.
- TRAUTWEIN W, Kassebaum DG, Nelson RM, Hecht H. Electrophysiological study of human heart muscle. *Circ Res*. 1962;**10**:306–312.
- TRAUTWEIN W, UCHIZONO K. Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. *Zellforsch Mikrosk Anat* 1963;**61**:96–109.
- TRISTANI-FIROUZI M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwieciński H, Fidzińska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, Tawil R. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002; **110**:381–388.
- TSAI TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS. Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1995;**268**:C1173–C1178.
- TSENG GN. I<sub>Kr</sub>: The hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:835–849.
- TSUJI Y, Ophof T, Kamiya K, Yasui K, Liu W, Lu Z, Kodama I. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc Res* 2000;**48**:300–309.
- TUCKER SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated K<sup>+</sup> channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996;**271**:H379–H385.
- UEBELE VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvβ2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:2406–2412.
- ULBRICHT W. Sodium channel inactivation: Molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005;**85**:1271–1301.
- VALENZUELA C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995;**69**:418–427.
- Van WAGONER DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;**80**:772–781.
- VANDENBERG CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:2560–2564.
- VAQUERO M, Calvo D, Jalife J. Cardiac fibrillation: from ion channels to rotors in the human heart. *Heart Rhythm* 2008;**5**:872–879.
- VARRO A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;**149**:133–142.
- VAUGHAN-WILLIAMS EM. Classification of antiarrhythmic drugs. In: *Symposium on cardiac arrhythmias*. Sandoe E, Flensted, Johnson E, Olesen KH. *AB Astra*. 1970:440–469.
- VELDKAMP MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balsler JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na<sup>+</sup> channel. *Circ Res* 2000;**33**:5–15.
- VILIN YY, Makita M, George AL, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channel. *Biophys J* 1999;**77**:1384–1393.
- VIRAG L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradzky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:790–797.
- VOIGT N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varro A, Van Wagoner DR et al. Left-to-right



- atrial inward-rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;**3**:472–480.
- WADA K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:197–201.
- WALLACE RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998;**19**:366–370.
- WALSH KB. A real-time screening assay for GIRK1/4 channel blockers. *J Biomol Screen* 2010;**15**:1229–1237.
- WALTON M, FOZZARD HA. The relation of  $V_{\max}$  to  $I_{Na}$ ,  $G_{Na}$ , and  $h$  infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 1979;**25**:407–420.
- WANG ZG, Pelletier LC, Talajic M, Nattel S. Effects of flecainide and quinidine on human atrial action potentials. Role of rate-dependence and comparison with guinea pig, rabbit, and dog tissues. *Circulation* 1990;**82**:274–283.
- WANG Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993a;**73**:1061–1076.
- WANG Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;**28**:1540–1546.
- WANG Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995a;**80**:805–811.
- WANG Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995b;**272**:184–196.
- WANG DW, Sato T, Arita M. Voltage dependent inhibition of ATP sensitive potassium channels by flecainide in guinea pig ventricular cells. *Cardiovasc Res* 1995c;**29**:520–525.
- WANG Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv $\beta$ 1 subunits. *J Biol Chem* 1996a;**271**:28311–28317.
- WANG DW, Kiyosue T, Sato T, Arita M. Comparison of the effects of class I anti-arrhythmic drugs, cibenzoline, mexiletine and flecainide, on the delayed rectifier K<sup>+</sup> current of guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1996b;**28**:893–903.
- WANG Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* 1998;**98**:2422–2428.
- WANG J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 2000;**115**:749–758.
- WANG H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007;**10**:32–39.
- WARREN M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dharmoon AS, Bagwe S, Taffet SM, Jalife J. Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:621–631.
- WATANABE S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* 1991;**266**:20803–20809.
- WEERAPURA M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* 2002;**540**:15–27.
- WEI J, Wang D, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden D, George A Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation* 1999;**99**:3165–3171.
- WEIDMANN S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955;**127**:213–224.

- WETTWER E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:1662–1669.
- WETTWER E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;**75**:473–482.
- WHORTON MR, MACKINNON R. Crystal structure of the mammalian GIRK2 K<sup>+</sup> channel and gating regulation by G proteins, PIP<sub>2</sub>, and sodium. *Cell*. 2011;**147**:199–208.
- WIBLE BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ Res* 1995;**76**:343–350.
- WIBLE BA, Yang Q, Kuryshev YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K<sup>+</sup> channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998;**273**:11745–11751.
- WIBLE BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K<sup>+</sup> efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 $\beta$  in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:17852–12862.
- WICKMAN K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;**20**:103–114.
- WIENER N, ROSENBLUETH A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex* 1946;**16**:205 – 265.
- WILDE AA, BRUGADA R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res* 2011; **108**:884–897.
- WINFREE AT. Spiral waves of chemical activity. *Science* 1972;**175**:634–636.
- WINFREE AT. Scroll-shaped waves of chemical activity in three dimensions. *Science* 1973;**181**:937–939.
- WINFREE AT. When time breaks down: the three-dimensional dynamics of electrochemical waves and cardiac arrhythmias. Princeton: Princeton University Press 1987:154–186.
- WINFREE AT. Electrical instability in cardiac muscle: phase singularities and rotors. *J Theor Biol* 1989;**138**:353–405.
- WITCHEL HJ, Dempsey CE, Sessions RB, Perry M, Milnes JT, Hancox JC, Mitcheson JS. The low-potency, voltage-dependent HERG blocker propafenone—molecular determinants and drug trapping. *Mol Pharmacol* 2004;**66**:1201–1212.
- WORKMAN AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001; **52**: 226–235.
- XIA M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**332**:1012–1019.
- XIE LH, Takano M, Noma A. Development of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997;**272**:H1741–H1750.
- XIE LH, John SA, Weiss JN. Spermine block of the strong inward rectifier potassium channel Kir2.1: dual roles of surface charge screening and pore block. *J Gen Physiol* 2002;**120**:53–66.
- XIE LH, John SA, Weiss JN. Inward rectification by polyamines in mouse Kir2.1 channels: synergy between blocking components. *J Physiol* 2003;**550**:67–82.
- XIE LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Long polyamines act as cofactors in PIP<sub>2</sub> activation of inward rectifier potassium (Kir2.1) channels. *J Gen Physiol* 2005;**126**:541–549.
- XIE LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008;**586**:1833–1848.
- XU J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:24761–24768.
- YAMADA M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Reviews* 1998;**50**:723–757.

- YAMASHITA T, Nakajima T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y. Flecainide inhibits the transient outward current in atrial myocytes isolated from the rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**274**:315–321.
- YAN DH, Nishimura K, Yoshida K, Nakahira K, Ehara T, Igarashi K, Ishihara K. Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K<sup>+</sup> currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* 2005;**563**:713–724.
- YANG J, Jan YN, Jan LY. Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 1995a;**14**:1047–1054.
- YANG T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1995b;**77**:1246–1253.
- YANG NB, HORN R. Evidence for voltage-dependent S4 movements in sodium channel. *Neuron* 1995;**15**:213–218.
- YANG N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996;**16**:113–122.
- YANG EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kv $\beta$  subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C-termini. *J Biol Chem* 2001;**276**:4839–4844.
- YANG D, Song LS, Zhu WZ, Chakir K, Wang W, Wu C, Wang Y, Xiao RP, Chen SR, Cheng H. Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003;**92**:659–667.
- 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, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:899–905.
- YEH SH, Chang HK, Shieh RC. Electrostatics in the cytoplasmic pore produce intrinsic inward rectification in kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2005;**126**:551–562.
- YELLEN G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 1991;**251**:939–942.
- YELLEN G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;**419**:35–42.
- YEOLA SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996;**78**:1105–1114.
- YEOLA SW, SNYDERS DJ. Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc Res* 1997;**33**:540–547.
- YOKOSHIKI H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;**274**:C25–C37.
- YOOL AJ, SCHWARZ TL. Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991;**349**:700–704.
- YU FH, CATTERALL WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003;**4**:207.1–207.7.
- YUAN W, Ginsburg K, Bers D. Comparison of sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1986;**493**:733–746.
- YUE L, Feng JL, Wang Z, Nattel S. Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2000;**46**:151–161.
- YUILL KH, HANCOX JC. Characteristics of single cells isolated from atrioventricular node of the adult guinea-pig heart. *Pflügers Arch* 2002;**445**:311–320.
- YUNOKI T, Teramoto N, Naito S, Ito Y. The effects of flecainide on ATP-sensitive K(+) channels in pig urethral myocytes. *Br J Pharmacol* 2001;**133**:730–738.
- ZAGOTTA WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 1990;**250**:568–571.
- ZARITSKY JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res* 2000;**87**:160–166.

- ZARITSKY JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001;**533**:697–710.
- ZAZA A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic  $Ca^{2+}$ -induced inward rectification of  $K^+$  current during the ventricular action potential. *Circ Res* 1998;**82**:947–956.
- ZHANG JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994;**372**:97–100.
- ZHANG M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as  $\beta$  subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;**88**:1012–1019.
- ZHANG Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG)  $K^+$  channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 2003;**278**:10417–10426.
- ZHANG L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, George AL Jr, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu YH, Ackerman MJ, Vincent GM. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 genotype. *Circulation* 2005;**111**:2720–2726.
- ZHOU Z, Gong Q, Epstein ML, January CT. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998;**273**:21061–21066.
- ZHOU M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001;**411**:657–661.
- ZHOU Y, MACKINNON R. The occupancy of ions in the  $K^+$  selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003;**333**:965–975.
- ZIMMER T, SURBER R. SCN5A channelopathies: an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;**98**:120–136.
- ZINGMAN LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE, Terzic A. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:13278–13283.
- ZIPES DP, WELLENS HJ. Sudden cardiac death. *Circulation* 1998;**98**:2334–2351.
- ZITRON E, Günth M, Scherer D, Kiesecker C, Kulzer M, Bloehs R, Scholz EP, Thomas D, Wiedenhammer C, Kathöfer S, Bauer A, Katus HA, Karle CA. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic  $\alpha_{1A}$  receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**44**:84–94.
- ZUHLKE RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999;**399**:159–162.
- ZYKOV VS. Analytic evaluation of the relationship between the speed of a wave of excitation in a two-dimensional excitable medium and the curvature of its front. *Biofizika* 1980;**25**:888–892.