



Títol del Treball:

**Caracterització de variants de significat incert situades
al gen codificant pel canal de sodi cardíac en cèl·lules
HEK-293T**

Estudiant: Elisabet Roura Fernández

Correu electrònic: elisabetrouraf@gmail.com

Grau en Biotecnologia

Tutor: Silvia Barrabés Vera

Correu electrònic: silvia.barrabes@udg.edu

Cotutor: Rebecca Martínez Moreno

Correu electrònic: rmartinez@gencardio.com

Empresa/Institució: Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 06/06/2023

AGRAÏMENTS.....	3
RESUM.....	4
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA.....	5
REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE	5
REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT	6
I INTRODUCCIÓ.....	7
1. Mort sobtada cardíaca (MSC).....	7
2. Canalopaties cardíques	7
2.1 Potencial d'acció cardíac (PA)	7
2.2 Electrocardiograma	8
3. Canal de sodi cardíac dependent de voltatge	9
3.1 Subunitat α	9
4. Síndrome de Brugada.....	10
4.1 Models experimentals cel·lulars en Síndrome de Brugada.....	12
5. Plantejament de la recerca	12
II OBJECTIVES.....	14
III MÈTODES I MATERIAL	15
1. Material.....	15
1.1 Línies cel·lulars	15
1.1.1. Bacteris.....	15
1.1.2. HEK-293T	15
1.2. Vector d'expressió.....	15
1.3. Anticossos.....	16
1.4. Tampons del Western Blot.....	16
1.5 Solucions de l'assaig d'Immunofluorescència.....	16
2. Disseny dels <i>primers</i>	17
3. Expressió heteròloga de les variants.....	18
3.1. Reacció de mutagènesis.....	18
3.2. Transformació	19
3.3. Purificació del vector	19
4. Seqüenciació	20
4.1. BigDye.....	20
4.2. Precipitació.....	21
4.3. Anàlisi de les seqüències	21

5. Cultius cel·lulars de cèl·lules HEK-293T.....	21
6. Transfecció de cèl·lules HEK-293T.....	21
7. Western Blot	22
8. Immunofluorescència.....	23
9. Anàlisi estadístic	24
IV RESULTATS	25
V DISSCUSIÓ	30
VI CONSLUSIONS	32
VII BIBLIOGRAIFA.....	33

AGRAÏMENTS

En primer lloc, com no podria ser d'una altra manera, agrair-te Rebecca aquesta gran oportunitat de desenvolupar el meu treball de fi de grau amb vosaltres. Formar part del grup de recerca de Gencardio de l'IdIBGi ha estat un enorme plaer. Gràcies per tot el suport, i per confiar més en mi que jo mateixa. Mai m'havia plantejat dedicar-me a la investigació biomèdica, tu has despertat aquest interès en mi.

Un bon ambient de grup ha sigut clau perquè cada matí en despertar-me no em fos gens complicat venir al laboratori. Per tant, vull agrair a la Natalia i l'Òscar per fer que el temps mort entre experiments passes molt més ràpid, els cafès només han sigut una excusa per explicar-nos els nostres drames. David, no me n'oblido de tu, fer servir el sarcasme ha sigut la teva manera d'animar-me i donar-me suport aquests mesos, això sí, no t'has cansat de dir-me una vegada i una altra: "Escriu". També voldria agrair a la resta de membres del grup la seva ajuda; Fabi, Guillermo, Mireia, Marcel i Estel.

Miquel, encara que estiguis per República Txeca vivint la teva millor vida, gràcies per les trucades i escoltar-me sempre que l'estrès s'ha apoderat de mi. També als meus amics de l'Erasmus, amb especial menció a la Mariola i la Isa, vosaltres per Polònia i jo a casa, sempre m'heu preguntat si portava bé el TFG i tenia uns dies per venir-vos a visitar, us trobo moltíssima a faltar.

Nina, les tardes a la biblioteca no haurien sigut el mateix sense tu. Al final sempre hem acabat delirant, parlant de com milloraríem el món i com de diferent hauria de ser tot. Amb amics de veritat a prop, tot és més fàcil. Amb la Ruth i l'Elena hem fet que durant els caps de setmana valgués la pena l'esforç d'entre setmana.

A la meva família, tot i que em considero l'ovella negra per ser de ciències quan la resta heu tirat cap a la branca de la informàtica, heu intentat entendre el que us he explicat en tot moment. Mama, em coneixes i saps que la millor manera de calmar els meus nervis és portant-me berenar mentre faig feina. I els meus avis i tiets, que tot i no saber de què parlo es nota d'una hora lluny l'orgull de què la neta més gran acabi la Universitat. Roger, a tu t'incloc en aquest sac, gràcies per tot. Sense vosaltres no hagués sigut possible.

Finalment, gràcies Sílvia Barrabés per l'acompanyament acadèmic i l'ajuda per a que aquest treball de final de grau sortís endavant.

RESUM

La Mort sobtada cardíaca es defineix com aquella mort natural i inesperada per causes cardíques, i és la causant de més del 60% de morts per raons cardiovasculars. La Síndrome de Brugada (SBr) és una canalopatia que pot provocar mort sobtada cardíaca, i pot ser causada per variants en el gen *SCN5A*, que codifica pel canal de sodi cardíac ($Na_v1.5$). En aquest treball s'ha estudiat el possible efecte de les variants de significat incert *SCN5A_c.2302A>G* i *SCN5A_c.2332 C>T*, trobades en pacients amb SBr, utilitzant com a model cel·lular les cèl·lules HEK-293T. S'ha observat que ambdues variants disminueixen l'expressió de $Na_v1.5$ i en modifiquen la seva localització. Aquest estudi és molt inicial i caldria realitzar més experiments, però aquest treball posa en manifest la importància de la conservació nucleotídica d'aquesta regió de $Na_v1.5$.

RESUMEN

La muerte súbita cardíaca se define como aquella muerte natural e inesperada por causas cardíacas, y es la causante de más del 60% de muertes por razones cardiovasculares. El Síndrome de Brugada (SBr) es una canalopatía que puede provocar muerte súbita cardíaca, y puede ser causada por variantes en el gen *SCN5A*, que codifica para el canal de sodio cardíaco ($Na_v1.5$). En este trabajo de fin de grado se ha estudiado el posible efecto de las variantes de significado incierto *SCN5A_c.2302A>G* y *SCN5A_c.2332 C>T*, halladas en pacientes que padecen SBr, utilizando como modelo celular las células HEK-293T. Se ha observado que ambas variantes disminuyen la expresión de $Na_v1.5$ y que modifican su localización. Este estudio es muy inicial y sería conveniente realizar más experimentos, pero este trabajo pone en manifiesto la importancia de la conservación nucleotídica de esta región de $Na_v1.5$.

ABSTRACT

Sudden cardiac death is defined as a natural and unexpected death due to cardiac causes, and is responsible for more than 60% of deaths caused by cardiovascular reasons. Brugada syndrome (BrS) is a channelopathy that can lead to sudden cardiac death, and can be caused by variants in the *SCN5A* gene, which encodes for the cardiac sodium channel ($Na_v1.5$). In this final degree thesis we have studied the possible effect of the variants of uncertain significance *SCN5A_c.2302A>G* and *SCN5A_c.2332 C>T*, found in patients with BrS, using HEK-293T cells as a cellular model. It has been observed that both variants decrease the expression of $Na_v1.5$ and modify its localization. This study is very initial and it would be convenient to perform more experiments, but this work shows the importance of the nucleotide conservation of this region of $Na_v1.5$.

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

Per l'estudi de canalopaties cardíques, en ocasions s'ha fet ús d'animals. Es podria considerar immoral, ja que els animals tenen dret a ser respectats, i sovint implica dolor i patiment. Actualment, hi ha alternatives com models *in vitro*, o *in silico*.

Avui en dia, també s'estan emprant models cel·lulars, com sistemes d'expressió heteròloga o cèl·lules mare de plenipotència induïda derivades (iPSc) al teixit cardíac.(1) Tot i això, els models animals permeten replicar els processos biològics d'una forma més precisa, amb sistemes fisiològics similars als humans.

L'avenç científic està permetent la millora dels models cel·lulars, per exemple les iPSc permeten replicar les condicions natives dels cardiomiòcits. Tot i això, aquest model, presenta un fenotip immadur en comparació amb els cardiomiòcits adults, amb una expressió gènica similar a les cèl·lules cardíques fetals. (2,3)

Considero que hi ha models cel·lulars que s'aproximen prou a les condicions reals que permeten reduir l'ús d'animals. Depenent de la finalitat de l'experiment, utilitzar models cel·lulars és suficient per treure conclusions extrapolables als éssers humans sense la necessitat de causar patiment animal.

REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

La bretxa de gènere en la salut és un problema contemporani, en les malalties cardiovasculars no és una excepció.

Un exemple seria la falta d'estudi dels símptomes d'infart de miocardi en les dones, fins ara no s'ha contemplat una possible diferenciació dels símptomes en funció del gènere i tradicionalment s'ha tendit a fer extensius a les dones els símptomes que pateixen els homes. (4)

Per abordar aquesta problemàtica s'han de treballar diferents aspectes en l'àmbit de la investigació com la representació del gènere femení en els estudis clínics.

Les malalties cardiovasculars són la primera causa de mort en dones arreu del món, tot i això, segons un estudi publicat l'any 2019 només un 38% dels assajos clínics sobre malalties cardiovasculars van incloure dones com a participants. A més a més, en aquells on hi havia representació femenina, aquesta sempre era menor. (5)

En conclusió, la inclusió de les dones en els assajos clínics és clau per comprendre com les malalties afecten les dones i com es poden desenvolupar tractaments més efectius i personalitzats. És necessari regular la participació de les dones per detectar com pot afectar de diferent manera una mateixa malaltia. D'aquesta manera, en un futur serà més fàcil garantir les mateixes oportunitats sanitàries sense tenir en compte el seu gènere.

REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

Cada dia en els laboratoris d'investigació es genera una gran quantitat de residus, tant biològics com químics. Cal tenir consciència de l'impacte que això pot provocar en el medi ambient.

És important que els laboratoris implementin practiques adequades de gestió de residus, com ara la separació i classificació dels diferents tipus de residus, el reciclatge de vidre i plàstic i l'eliminació adequada de residus biològics. A més a més, també és crucial fomentar la col·laboració i intercanvi de coneixements per evitar la duplicació d'esforços i malbaratament de recursos.

Diversos d'aquests punts els podem trobar recollits en el codi de bones pràctiques en la recerca que està penjat a la pàgina web de l'IDIBGI. (6) Aquest treball de final de grau s'ha realitzat intentant reduir al màxim la generació de residus, i s'ha fet una bona gestió d'aquests.

I INTRODUCCIÓ

1. Mort sobtada cardíaca (MSC)

La MSC es defineix com aquella mort natural i inesperada per causes cardíques, que té lloc durant l'hora posterior a l'aparició dels símptomes. Per a morts no presenciades, la definició de la MSC requereix que el difunt hagi estat vist estable menys de 24 hores abans de ser trobat mort, i s'ha de descartar qualsevol causa no cardíaca potencialment letal. (7)

La MSC és un problema de salut pública, ja que causa més del 60% de morts per raons cardiovasculars. (8) És més freqüent en nadons des del naixement fins als 6 mesos d'edat, i en adults d'entre els 45 i els 75 anys. A més a més, té més incidència en homes que en dones. (7,9)

La principal causa de la MSC són les malalties coronàries, ja que suposen el 75% del total de morts per MSC. En el 50% dels pacients que pateixen malalties coronàries, la MSC és la primera manifestació de la malaltia. (8)

El 25% restant de defuncions per MSC són causades per cardiomiopaties i canalopaties. Les cardiomiopaties són més comunes respecte a les canalopaties, i es caracteritzen per alteracions estructurals en el múscul cardíac que poden variar-ne la mida, la rigidesa i el gruix, repercutint en el bombeig de la sang en el cor. (10) Si en realitzar l'autòpsia no es detecten anomalies en l'estructura del cor, és sospita d'una canalopatia.

2. Canalopaties cardíques

Les canalopaties són malalties arritmogèniques causades per alteracions als canals iònics que es troben a les membranes cel·lulars, i poden ser donades per variants en els gens que codifiquen pels canals iònics o les seves proteïnes moduladores, o per factors adquirits. (11) Així doncs, a les canalopaties cardíques hi trobem anomalies en els canals iònics de les cèl·lules cardíques. Quan les anomalies genètiques provoquen defectes en la funcionalitat dels canals, les canalopaties resultants poden predisposar a arrítmies potencialment mortals. (12)

Les principals canalopaties cardíques són:

- **Síndrome de QT llarg:** es caracteritza per una repolarització ventricular retardada, que es manifesta en l'electrocardiograma (ECG) com una prolongació del segment QT. (13)
- **Síndrome de QT curt:** es caracteritza per un segment QT més curt en els ECG. (14)
- **Síndrome de Brugada:** es caracteritza per una elevació del segment ST a l'ECG. Informació més detallada es troba a l'apartat 6.
- **Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica:** es caracteritza per un episodi de síncope com a resposta a l'esforç físic o a emocions intenses. (15)

2.1 Potencial d'acció cardíac (PA)

Les cèl·lules excitablem cardíques en fase de repòs presenten una polaritat, amb càrregues negatives al seu interior i positives al seu exterior. Això causa una diferència de potencial, també conegut com a potencial de membrana. (16)

La fase de repòs s'altera quan hi ha una entrada i/o sortida de ions a través dels canals iònics voltatge-dependents presents a la membrana cel·lular, variant-ne el potencial i

despolaritzant-la. El potencial d'acció es defineix com el conjunt de canvis coordinats que tenen lloc en el potencial de membrana. Els principals ions que participen en aquest procés són el sodi (Na^+), el calci (Ca^{2+}) i el potassi (K^+). (17)

La fase de despolarització de les cèl·lules causa la contracció del múscul cardíac. Seguidament, les cèl·lules tornen al seu potencial de membrana inicial, fet que es coneix com a repolarització i que causa la relaxació del miocardi. (18)

El potencial d'acció dels cardiomiòcits es pot dividir en diferents fases (Figura 1). Cal tenir en compte que els diferents tipus de cardiomiòcits (ventricular, auricular, cèl·lules marcapassos) tenen el seu propi PA. La superposició del PA dels diferents tipus cel·lulars presents a les diferents parts del miocardi és el que dona lloc a l'ECG.

- Fase 0: Despolarització
- Fase 1: Repolarització precoç
- Fase 2: Altiplà
- Fase 3: Repolarització
- Fase 4: Fase de repòs

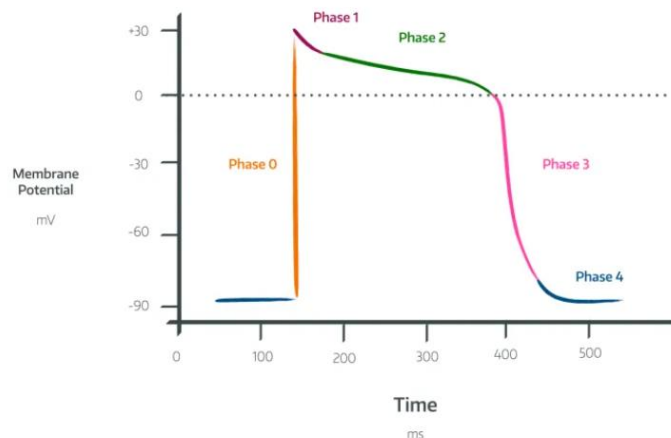


Figura 1 Representació gràfica de com varia el potencial de membrana durant les diferents fases del potencial d'acció dels cardiomiòcits ventriculars. Adaptada de: <https://www.anaesthasier.com/the-cardiac-action-potential/>

2.2 Electrocardiograma

L'ECG és una línia gràfica que mostra canvis en l'activitat elèctrica del cor durant un temps determinat. La mesura de l'ECG es realitza amb un instrument anomenat electrocardiògraf. (19) L'ECG representa la suma de l'activitat elèctrica generada pels cardiomiòcits en les diferents regions del cor (Figura 2), (20) i és una eina important en l'avaluació de la funció cardíaca i en el diagnòstic de diverses malalties cardíques.

En l'ECG podem diferenciar ones, segments i complexos. En primer lloc, l'ona P representa la despolarització auricular, i l'ona T la repolarització ventricular. (21) El complex QRS és l'agrupament de l'ona Q, R i S i representen la despolarització ventricular. El segment que es troba entre el complex QRS i l'ona T s'anomena segment ST. (21,22) Finalment, la línia basal representa la fase de repòs dels ventricles quan el potencial de membrana ha tornat al seu valor inicial abans de la despolarització.

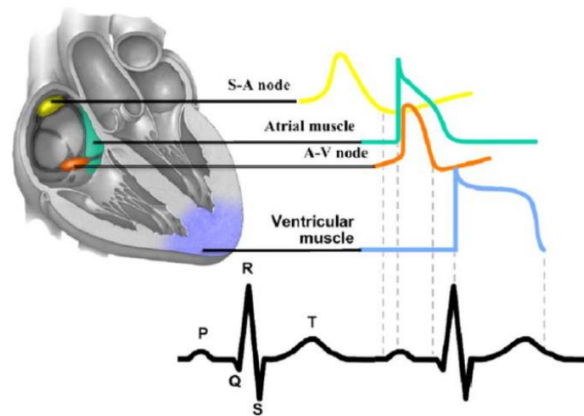


Figura 2. Esquema de les parts d'un electrocardiograma. Recuperada de: Giudicessi et al. 2013 (23).

3. Canal de sodi cardíac dependent de voltatge

Els canals iònics són proteïnes situades a la membrana lipídica de les cèl·lules. Formen un porus que facilita el transport d'ions, tant cap a l'exterior com a l'interior de les cèl·lules, a favor del seu gradient electroquímic. (24)

Els canals iònics es poden classificar segons molts criteris diferents: els ions que passen a través d'ells, els factors que provoquen la seva obertura/tancament, per les característiques estructurals, etc. Entre les diferents causes que poden induir a l'obertura i/o tancament dels canals s'hi poden trobar els canvis del potencial de membrana de les cèl·lules, lligands, missatgers secundaris, la llum i la temperatura entre d'altres. (11)

Els canals iònics dependents de voltatge s'obren i es tanquen en resposta als canvis del potencial de membrana. Dins dels canals dependents de voltatge, s'hi troben els canals de sodi dependents de voltatge (Na_v). Aquests canals tenen un paper molt important, ja que són els que inicien el potencial d'acció de les cèl·lules, transmetent els impulsos de despolarització ràpidament a les cèl·lules i xarxes cel·lulars. (25)

Aquests canals estan formats per una subunitat α associada a una o dues subunitats β . Les subunitats β desenvolupen un paper auxiliar o regulador en els Na_v i no formen part del porus. Les diferents subunitats β estan codificades pels gens *SCN1B*, *SCNB2*, *SCNB3* i *SCNB4* i es tradueixen en les proteïnes $\beta 1$ i la seva variant d'*splicing* $\beta 1b$, $\beta 2$, $\beta 3$ i $\beta 4$. (26)

3.1 Subunitat α

La subunitat α és la subunitat més gran dels canals de sodi dependents de voltatge. L'expressió d'aquesta subunitat és suficient per desenvolupar les propietats claus del canal, és a dir, perquè la proteïna sigui funcional. (27)

Existeixen 10 subtipus diferents de subunitats α , codificats per un total de 10 gens que van des del *SCN1A* fins al *SCN11A*. Aquests 10 gens codifiquen per les corresponents proteïnes: del $Na_v1.1$ fins al $Na_v1.9$. (27)

L'expressió dels diferents gens varia segons el teixit cel·lular on es troben. Per exemple, el canal de sodi cardíac $Na_v1.5$ està codificat pel gen *SCN5A* i la seva expressió té lloc principalment a les cèl·lules del teixit cardíac. (28) El gen *SCN5A* té una mida superior a 100 kB, es troba en el cromosoma 3p22 i està format per un total de 28 exons. (29)

La subunitat α té una mida d'uns 260 kDa i està formada per 4 dominis homòlegs transmembrana (DI-DIV) que constitueixen un porus a la membrana. Cada domini està format per un total de 6 segments transmembrana (S1-S6), i els diferents segments dels dominis es troben units per *loops* intra i extracel·lulars (Figura 3). (28)

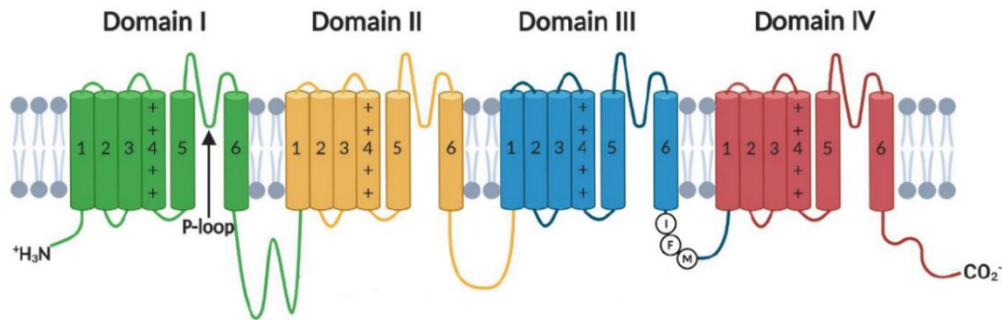


Figura 3. Estructura de la subunitat α del canal de sodi cardíac dependent de voltatge. Adaptada de Martínez Moreno 2021 (1)

4. Síndrome de Brugada

La Síndrome de Brugada (SBr) és una malaltia cardíaca hereditària que causa fibril·lació ventricular i MSC. Aquesta malaltia es caracteritza per una elevació del segment ST de l'ECG i per anormalitats en la conductivitat del ventricle dret, en un cor estructuralment normal. Tot i això, s'han detectat alguns casos amb alteracions menors en l'estructura cardíaca. (30)

Aquesta malaltia va ser descrita per primer cop l'any 1992 en un article publicat en el "*Journal of the American Collage of Cardiology*". Exposava el cas de 8 pacients que presentaven bloqueig de la branca dreta al cor, una elevació persistent del segment ST, i havien estat ressuscitats repetidament de MSC. Per aquest motiu, en un inici, es va denominar "la síndrome del bloqueig de branca dreta, elevació del segment ST persistent i mort sobtada". No va ser fins al 1996 que es va anomenar Síndrome de Brugada. (31,32) S'ha estimat que la SBr és responsable d'entre el 4% i el 12% dels casos de MSC, i de, com a mínim, el 20% dels casos de MSC en pacients amb estructura cardíaca normal. (33)

Els símptomes normalment comencen durant l'edat adulta, als 41 ± 15 anys. Tot i això, el pacient més jove diagnosticat amb SBr tenia 2 dies d'edat, i el més gran 84 anys. (33) La SBr no s'ha lligat al sexe però s'ha descrit que el fenotip és d'entre 8 i 10 vegades més freqüent en homes que en dones. Entre el 71% i el 77% dels pacients en estudis de SBr són homes. (34)

El 35% dels casos, aproximadament, de pacients amb SBr son causats per variants genètiques, i el patró d'herència és majoritàriament autosòmic dominant. La primera variant que es va associar al SBr va ser en el gen *SCN5A*, que codifica per la subunitat α del canal de sodi $Na_v1.5$. (35) Entre el 20% i el 25% dels pacients afectats per la SBr presenten variants en aquest gen. (30) L'alteració més freqüent provocada per variants en el gen *SCN5A* és la pèrdua de funció del canal de sodi cardíac. Fins ara, s'han descrit més de 400 variants en aquest gen (Figura 4). (2,36)

Aquestes variants tenen una penetrància incompleta i una expressivitat variable, per aquest motiu membres d'una mateixa família que tenen la mateixa variant sovint presenten fenotips clínics diferents. Per tant, determinants genètics i ambientals influeixen en les manifestacions fenotípiques d'una determinada variant en el context d'un pacient en particular. (23)

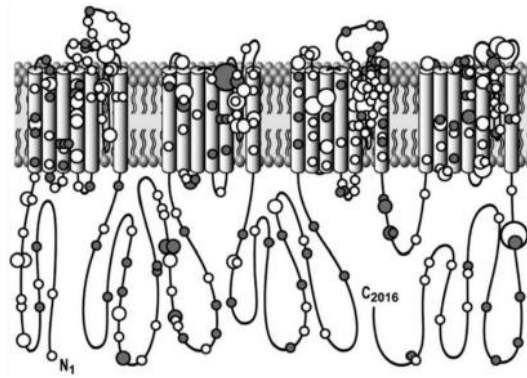


Figura 4. Localització de variants en el canal Nav1.5 relacionades amb SBr. Les variants que només canvia un nucleòtid estan indicades amb cercles de color blanc, altres tipus de mutacions amb cercles de color gris. Els cercles més petits indiquen variants que només s'han observat un cop, els cercles mitjans variants observades en entre 2 i 4 pacients, els cercles grans variants observades en entre 5 i 9 pacients i els cercles més grans variants observades en almenys 10 pacients. Adaptada de: Kapplinger et al. 2010 (37)

També s'ha relacionat amb la SBr variants en altres gens, com els que codifiquen per subunitats de canals cardíacs de potassi i calci, i de proteïnes involucrades en la regulació d'aquests. (35) Tot i això, la majoria d'aquestes mutacions no són directament la causa de la malaltia o, si més no, no són l'única causa. (32)

El diagnòstic de la SBr es basa en la presència espontània o induïble del patró tipus I en l'ECG del pacient (Figura 5), que es caracteritza per una elevació de més de 2 mm en el segment ST seguit d'una ona T negativa. Tot i que hi ha altres patrons, anomenats tipus II i tipus III, només s'utilitza el patró de tipus I per diagnosticar SBr. (32,38)

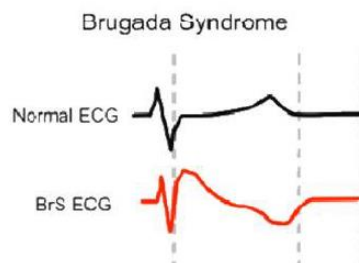


Figura 5. El gràfic superior de color negre representa l'ECG d'un pacient sa, i el vermell la representació esquemàtica d'un ECG d'un pacient amb SBr de tipus I. Adaptada de: Giudicessi et al. 2013 (23)

El patró de tipus I en els ECG només s'observa de manera espontània en el 25% dels casos. Per aquest motiu, cal realitzar un test farmacològic amb fàrmacs bloquejadors dels canals de sodi, com ara ajmalina, flecaïnida o procaïnàmid, per a poder veure l'alteració en el patró de l'ECG. (36)

La major part dels pacients amb la SBr romanen asimptomàtics durant quasi tota la seva vida, per aquest motiu moltes vegades no es diagnostica la malaltia fins que no apareix una síncope o MSC. (36) A l'hora de plantejar el tractament pels pacients amb la SBr, s'han de tenir en compte els símptomes. En pacients que ja hagin patit una mort sobtada recuperada o un esdeveniment arrítmic ventricular documentat, la indicació és l'implant d'un desfibril·lador automàtic (DAI). En aquells pacients que presenten síncope sense MSC o arrítmies ventriculars documentades, cal estudiar l'origen de la síncope abans de procedir. En els pacients amb síncope inexplicat o amb

un perfil clarament cardiogènic cal considerar l'implant d'un DAI, ja que el risc de MSC és alt. (36)

4.1 Models experimentals cel·lulars en Síndrome de Brugada

S'han realitzat diversos estudis per tal d'entendre els mecanismes que afecten les canalopaties, tant en models animals com cel·lulars. El model de murins és el més comú dels models animals per estudiar canalopaties, tot i que també hi ha estudis que s'han dut a terme amb models canins i porcins.(39–41)

L'ús de models cel·lulars també està molt estès, com ara sistemes d'expressió heteròloga i cèl·lules específiques de teixit derivades de cèl·lules mares pluripotents induïdes (iPSC).

Els models d'expressió heteròloga consisteixen en l'expressió d'un gen o part d'un gen en un organisme hoste que no el té de forma natural. La inserció del gen a l'hoste heteròleg es realitza mitjançant tecnologia d'ADN recombinant.

En aquest treball de final de grau es van utilitzar sistemes d'expressió heteròloga en cèl·lules HEK-293T.

5. Plantejament de la recerca

Les variants que es van estudiar en aquest treball són dues variants de significat incert trobades per la unitat de diagnòstic clínic de Gencardio de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IdIBGi), en pacients diagnosticats amb SBr. Les dues variants estudiades (*SCN5A_c.2302A>G* i *SCN5A_c.2332 C>T*) es troben localitzades en el gen *SCN5A* que codifica per $Na_v1.5$, més específicament en el *loop* citoplasmàtic que uneix l'S2 amb l'S3 del DII de la proteïna (Figura 6). Tots els pacients presentaven les dues variants estudiades en heterozigosis.

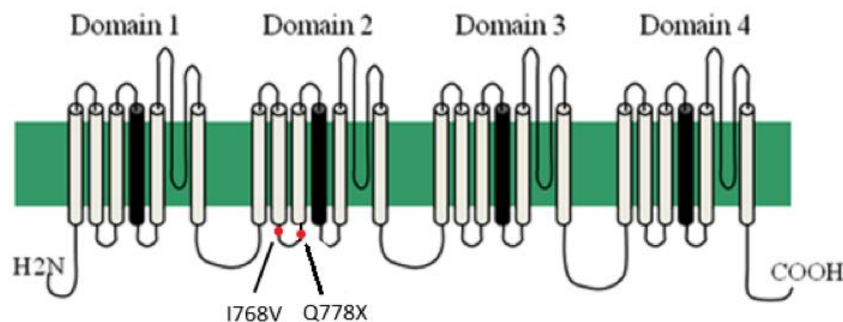


Figura 6. Localització aproximada de les variants $Na_v1.5_p.I768V$ i $Na_v1.5_p.Q778X$ en la subunitat α de $Na_v1.5$ senyalitzades amb un punt vermell. Adaptada de Aoki et al. 2017 (42)

La primera de les variants és la *SCN5A_c.2302A>G* ($Na_v1.5_p.I768V$), que es va trobar en un home de 41 anys, en dues dones de 42 i 36 anys, i en un nadó de 4 mesos. La variació provoca que l'aminoàcid en la posició 768 que es tradueix en una Isoleucina es canviï per una Valina. Tot i que està reportada, mai ha estat caracteritzada. L'eina PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), que prediu el possible impacte de variants d'un sol nucleòtid en l'estructura i funció de les proteïnes, ha predit que aquesta variant podria ser benigne.

La segona variant és la *SCN5A_c.2332C>T* ($Na_v1.5_p.Q778X$), i es va trobar en un pacient de gènere masculí de 13 anys d'edat. La variació provoca que l'aminoàcid 778 que es tradueix en una Glutamina passi a ser un codó *stop*. Per tant, el $Na_v1.5$ queda truncat en l'aminoàcid 778 d'un total de 2015 aminoàcids.

Ambdues variants estan situades en una regió d'alta conservació en el gen *SCN5A* entre diferents espècies (Figura 7).

A	<i>SCN5A_HUMÀ</i>	761	TAEMTFKI	I	AL	DP	Y	Y	F	Q	Q	G	W	N	I	F	D	S	I	I	V	I
	<i>SCN3A_HUMÀ</i>	804	TAEMVLKI	I	AM	DP	Y	Y	F	Q	E	G	W	N	I	F	D	G	I	I	V	F
	<i>SCN4A_HUMÀ</i>	622	TAEMVLKL	I	AM	DP	Y	E	F	Q	Q	Q	W	N	I	F	D	S	I	I	V	T
	<i>SCN8A_HUMÀ</i>	797	TAEMFLKL	I	AM	DP	Y	Y	F	Q	E	G	W	N	I	F	D	G	F	I	V	S
	<i>SCN10A_HUMÀ</i>	708	TAEMVFKI	I	AF	D	P	Y	Y	F	Q	K	K	W	N	I	F	D	C	I	I	V
B	<i>SCN5A_HUMÀ</i>	761	TAEMTFKI	I	AL	DP	Y	Y	F	Q	Q	G	W	N	I	F	D	S	I	I	V	I
	<i>SCN5A_RATOLÍ</i>	761	TAEMTFKI	I	AL	DP	Y	Y	F	Q	Q	G	W	N	I	F	D	S	I	I	V	I
	<i>SCN5A_RATA</i>	762	TAEMTFKI	I	AL	DP	Y	Y	F	Q	Q	G	W	N	I	F	D	S	I	I	V	I
	<i>SCN5A_GAT</i>	760	TAEMTFKI	I	AL	DP	Y	Y	F	Q	Q	G	W	N	I	F	D	S	I	I	V	I
	<i>SCN5A_GOS</i>	759	TAEMTFKI	I	AL	DP	Y	Y	F	Q	Q	G	W	N	I	F	D	S	I	I	V	I

Figura 7. Alineament de seqüències de la regió de Nav1.5 que contenen la variant I768V (rectangle vermell) i la variant Q778X (rectangle blau) realitzades amb uniprot (<https://www.uniprot.org/align>). La posició del primer aminoàcid de cada seqüència es troba indicat a l'esquerra. **A:** Alineament de seqüències dels gens de la família de canals de sodi dependents de voltatge en humans. **B:** Alineament de seqüències del gen que codifica per Nav1.5 de diferents espècies.

II OBJECTIVES

The central hypothesis is that the variants *SCN5A_c.2332C>T* and *SCN5A_c.2302A>G* could have a negative effect on the expression of the protein Nav1.5. And also, that they could be responsible or contribute to the phenotype of BrS of the patients where the variants were found.

To test this general hypothesis, we proposed the following 3 objectives related to the variants of uncertain significance:

- To obtain the expression vector pcDNA3.1-*SCN5A* that contains each of the variants separately, through site-directed mutagenesis, followed by the transformation in *E.coli* DH5 α cells, the vector purification and its sequencing.
- To determine the protein expression of the wild type (Nav1.5^{WT}) and mutant (Nav1.5^V) cardiac voltage-gated sodium channel, either in homozygosis or heterozygosis, in transfected HEK-293T cells using the Western Blot technique.
- To observe the protein localization of the of the wild type (Nav1.5^{WT}) and mutant (Nav1.5^V) cardiac voltage-gated sodium channel, either in homozygosis or heterozygosis, in transfected HEK-293T cells using an immunofluorescence assay.

III MÈTODES I MATERIAL

1. Material

1.1 Línies cel·lulars

1.1.1. Bacteris

Els bacteris que es van utilitzar per obtenir els diferents vectors d'expressió són els E.Coli DH5 α (ThermoFisher Scientific (Massachusetts, Estats Units)). El creixement dels bacteris es va portar a terme utilitzant els següents medis (Taula 1):

Taula 1. Medis per al creixement d'E.coli DH5 α

Medi	Composició	Companyia	Informació addicional
Brou LB	2 g en 100 mL d'aigua mQ	Sigma – Aldrich – Merck (Darmstadt, Alemanya)	-
Agar LB	4 g en 100 mL d'aigua mQ	NYZTech (Lisboa, Portugal)	Afegir ampicil·lina (Sigma-Aldrich-Merck) i Dispensar 20 mL per placa

1.1.2. HEK-293T

Les cèl·lules que es van utilitzar per l'expressió heteròloga del gen *SCN5A* són les cèl·lules *human embryonic kidney* (HEK-293T; cèl·lules embrionàries de ronyó) (Health Protection Agency Culture Collections-Salisbury, Regne Unit). Es van mantenir rutinàriament a 37°C amb el medi Duplecco's Modified Eagle's (DMEM) high glucose + GlutaMAXTM suplementat (Gibco-Thermo Fisher Scientific). (Taula 2)

Taula 2. Composició del medi de treball de les cèl·lules HEK-293T.

Components	Companyia
DMEM	Sigma-Aldrich-Merck
Sèrum fetal boví (FBS) 10%	Sigma-Aldrich-Merck
Penicil·lina – Estreptomicina (Pen-Strep) 1%	Sigma-Aldrich-Merck
Sodi piruvat 0.11mg/ml	Sigma-Aldrich-Merck

1.2. Vector d'expressió

El vector d'expressió pcDNA3.1 (Figura 8) que es va utilitzar per introduir el cDNA humà del gen *SCN5A* (pcDNA3.1-*SCN5A*) va ser un generós regal del Dr. Matteo Vatta (Baylor Collage of Medicine, Houston, TX, USA).

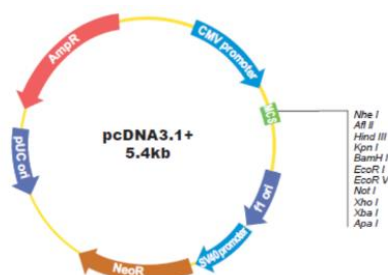


Figura 8. Mapa del vector pcDNA3.1 Recuperat de : <https://www.molecularcloud.org/p/introduction-on-pcdna3.1-pcdna3.1-vectors-373>

1.3. Anticossos

L'anticòs primari que es va utilitzar en els experiments de Western Blot i Immunofluorescència va ser el *rabbit* anti-SCN5A Na_v1.5 (ProteinTech (Manchester, Regne Unit)). L'anticòs secundari que es va emprar va ser el *goat anti-rabbit* (Jackson ImmunoResearch Labs (Baltimore, Estats Units)).

1.4. Tampons del Western Blot

La composició del tampó de lisis que es va emprar per a llisar les cèl·lules HEK-293T es troba detallat a la Taula 3.

Taula 3. Composició del tampó de lisis.

Components	Companyia
50 mM Trics/HCl pH 6.8	Sigma-Aldrich-Merck
10% Glicerol	Sigma-Aldrich-Merck
2% SDS	Sigma-Aldrich-Merck

Per realitzar els experiments de Western Blot es van utilitzar els tampons descrits a la Taula 4.

Taula 4. Composició dels tampons utilitzats al protocol de Western Blot.

Tampó	Composició	Companyia
Tampó de mostra Laemmli 4X	Comercial suplementat amb un 10% de β -mercaptoetanol	Bio-Rad (Califòrnia, Estats Units)
Tampó d'electròlisi 10X	Tris 25 mM; Glicina 192 mM; 0.1% SDS	Sigma-Aldrich-Merck
Tampó de transferència 10X	Tris 25 mM; Glicina 192 mM	Sigma-Aldrich-Merck

1.5 Solucions de l'assaig d'Immunofluorescència

Les composicions de la solució de fixació (Taula 5), la solució de *Quenching* (Taula 6) i la solució de bloqueig i permeabilitzant (Taula 7) que es van utilitzar per a la immunofluorescència són les següents:

Taula 5. Composició de la solució de fixació.

Components	Companyia
Tampó fosfat salí (PBS) ⁺	Sigma-Aldrich-Merck
4% Paraformaldehid	Sigma-Aldrich-Merck

Taula 6. Composició de la solució de *Quenching*.

Components	Companyia
Glicina 1M	Sigma-Aldrich-Merck
NH ₄ CL	Sigma-Aldrich-Merck
PBS ⁺	Sigma-Aldrich-Merck

Taula 7. Composició de la solució de bloqueig i permeabilitzant.

Components	Companyia
Saponina 0.0025%	Sigma-Aldrich-Merck
Gelatina de pell de peix d'aigua freda 0.7%	Sigma-Aldrich-Merck
NaN ₃ 0.02%	Sigma-Aldrich-Merck
PBS ⁺	Sigma-Aldrich-Merck

2. Disseny dels primers

En aquest treball es van estudiar dues variants diferents, localitzades al gen *SCN5A*: *SCN5A_c.2332C>T* (Nav1.5^{Q778X}), i *SCN5A_c.2302A>G* (Nav1.5^{I768V}). Per dissenyar els primers necessaris per la mutagènesis del vector *SCN5A wild type* (WT), es van emprar dues metodologies diferents per a cada variant. Pel primer mètode, es va utilitzar la pàgina web <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>, on es va seleccionar el kit *Lightning*, i es va enganxar la seqüència de cDNA del gen *SCN5A*. A continuació es va canviar manualment el nucleòtid desitjat i el programa va dissenyar els primers.

Pel segon mètode, es van dissenyar els primers a mà. Es va crear una construcció de 10 nucleòtids *upstream* del nucleòtid a mutar, el nucleòtid mutat, 10 nucleòtids *downstream* del nucleòtid a mutar i 22 nucleòtids més. Aquest valors poden variar si allargant o escurçant la seqüència del primer s'aconsegueix que el primer acabi o comenci amb una G o C (Figura 9).

Els aspectes que es van tenir en compte per dissenyar els primers van ser: que l'allargada dels primers fos entre 25 i 45 pb, que la temperatura de *melting* (T_m) fos ≥ 78°C, que el contingut de GC fos ≥40%, i que l'extrem dels primers acabés amb una o més G i/o C.

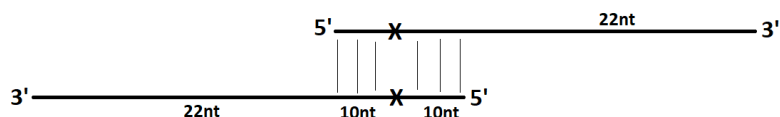


Figura 9. Esquema que es va seguir per a dissenyar els primers a mà.

Un cop dissenyats els primers es van validar a <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.

Es van comprar els 4 parells de primers dissenyats per a cada variant a l'empresa Condalab (Madrid, Espanya). (Taula 8)

Taula 8. Característiques dels primers dissenyats a través d'una pàgina web (1) i a mà (2).

Nom	Seqüències	Pes molecular (Da)	nmol	T _m
Nav1.5_Q778X_1	FW: 5' CTC GAC CCC TAC TAC TAC TTC TAA CAG GGC TGG AAC ATC TTC G 3'	13059	23,3	81
	RV: 5' CGA AGA TGT TCC AGC CCT GTT AGA AGT AGT AGT AGG GGT CGA G 3'	13388	19,6	81

Nav1.5_Q778X_2	FW: 5' CTA CTA CTT CTA ACA GGG CTG GAA CAT CTT CGA CAG CAT CAT C 3'	13107	23,8	79
	RV: 5' CAG CCC TGT TAG AAG TAG TAG TAG GGG TCG AGG GCA ATG ATC 3'	13083	19,8	81
Nav1.5_I768V_1	FW: 5' GCA GAG ATG ACC TTC AAG GTC ATT GCC CTC GAC CCC 3'	10966	22,9	80
	RV: 5' GGG GTC GAG GGC AAT GAC CTT GAA GGT CAT CTC TGC 3'	11157	21,4	80
Nav1.5_I768V_2	FW: 5' GAC CTT CAA GGT CAT TGC CCT CGA CCC CTA CTA CTA CTT CCA AC 3'	13268	22,7	82
	RV: 5' GGG CAA TGA CCT TGA AGG TCA TCT CTG CTG TGA AAA TCC CTG 3'	12929	23,4	80

Els *primers* enviats per la casa comercial es trobaven liofilitzats. Per hidratar-los a una concentració final de 1 µg/µL, es van resuspendre en 50% mQ H₂O / 50% TE. A partir del pes molecular i la concentració de la Taula 8 es va calcular el volum necessari de 50% mQ H₂O / 50% TE (Equació 1).

$$\text{Concentració (nmol)} * \frac{\text{Pes molecular g}}{\text{mol}} * \frac{1 \text{ mol}}{10^9 \text{ nmol}} * \frac{10^6 \mu\text{g}}{1 \text{ g}} = \mu\text{g} \rightarrow \mu\text{L}$$

Equació 1. Càlcul emprat per determinar el volum necessari de 50% mQ H₂O / 50% TE per hidratar els *primers*.

3. Expressió heteròloga de les variants

3.1. Reacció de mutagènesis

La reacció de mutagènesis per a cada variant estudiada es va realitzar amb el Kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene (California, Estats Units)). La mix de la mutagènesis es va realitzar en un tub de 1,5 mL (SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Alemanya)) (Taula 9).

Taula 9. Composició de la reacció de mutagènesis.

Components	Concentració final
Tampó de Reacció 10x	1X
50 ng/ µL Vector plantilla	50 ng
Primer Fw 100 ng/ µL	125 ng
Primer Rv 100 ng/ µL	125 ng
dNTP mix	N/D
Reactiu Quiksolution	N/D

A continuació, es va afegir 1 µL de enzim *Quikchange* a la mix de la reacció de mutagènesis. Finalment, els components es van traspasar a un pou d'una placa de 96 pous (Falcon-Corning (Nova York, Estats Units)). La reacció de mutagènesis es va realitzar al termociclador

Veriti™ (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific), amb un protocol de canvis de temperatura (Taula 10).

Taula 10. Perfil dels canvis de temperatura de la reacció de mutagènesis.

Temperatura	Duració	Cicles
95°C	2'	1
95°C	20''	18
60°C	10''	
68°C	9,5'	
68°C	5'	
4°C	∞	1

Per tal de digerir el DNA parental, es va tractar el producte de la mutagènesis amb l'enzim DPN1 (Thermo Fisher Scientific) durant 1h a 37°C.

Aquest procediment es va realitzar per cada parella de *primers* de cada variant, és a dir, tant pels *primers* dissenyats manualment com els dissenyats a través de la pàgina web.

3.2. Transformació

Per transformar els vectors que contenen les *SCN5A_c.2332C>T* (Nav1.5^{Q778X}), i *SCN5A_c.2302A>G* (Nav1.5^{I768V}), es va emprar la soca d'E.coli DH5α. Degut a que les cèl·lules són molt sensibles als canvis de temperatura es va treballar amb gel, posant els tubs d'1,5 mL a refredar abans de començar i tocant-los el mínim possible. A més a més, va ser necessari tenir preparat brou LB i plaques amb LB-Agar a 37°C. (Taula 1)

Es van aliquotar 45 µL de cèl·lules E.coli DH5α al tub posat anteriorment en fred, juntament amb 5 µL del producte de la reacció de mutagènesi procedent de l'apartat 3.1. El següent pas va consistir en sotmetre les cèl·lules a un xoc tèrmic: després d'incubar-les 30' en gel, es van incubar 30'' a 42°C al termobloc *TS1 ThermoShaker* (Biometra (Göttingen, Alemanya)), i finalment 2' en gel. A continuació, es van afegir 500 µL de Brou LB, escalfat a 37°C amb anterioritat, i es va incubar a 37°C durant 1 hora a 220 rpm.

Finalment es van sembrar 50 µL i 150 µL dels bacteris transformats en dues plaques diferents amb LB-Agar. Les plaques es van incubar invertides tota la nit (*overnight* (O/N)) a 37°C.

3.3. Purificació del vector

En primer lloc, per purificar el vector es van picar les colònies de les plaques amb E.Coli DH5α transformades de l'apartat 3.2. i es van incubar en un tub amb 4 ml de Brou LB i 100 mg/mL d'Ampicil·lina a 37 °C O/N a 220 rpm.

L'endemà, es va preparar un estoc de 50% glicerol/50% cultiu en criovials (SARSTEDT AG & Co. KG), fins a un volum d'1 mL, que posteriorment es van emmagatzemar a -80 °C.

El cultiu restant es va usar per purificar el vector amb una *MiniPrep*, fent servir el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel GmbH & Co KG (Duren, Alemanya)), segons les especificacions del fabricant.

El DNA obtingut després de l'elució es va quantificar amb el NANODROP-1000 (Thermo Fisher Scientific) amb una absorptió de 260 nm, ja que en aquesta longitud d'ona els àcids nucleics absorbeixen. El NANODROP-1000 va proporcionar els valors de les ràtios A260nm/A280nm i A260nm/A230nm, aquestes es van utilitzar per determinar la puresa del DNA obtingut. A260nm/A280nm ha de tenir un valor superior a 1,8, en cas contrari indica la presència d'altres proteïnes. D'altra banda, la ràtio A260nm/A230nm ha de comprendre un valor entre 2,0 i 2,2 i indica la presència de solvents orgànics. (43)

Per comprovar la mida del vector es va preparar un gel d'Agarosa i es van carregar les mostres resultants de la *MiniPrep*. Totes aquelles mostres que varen obtenir la mida esperada es van seqüenciar tal com s'explica en l'apartat 4, la resta es van descartar. Les mostres es van seqüenciar per tal d'assegurar que els bacteris transformats van incorporar correctament el vector, i que aquest contenia la variant d'interès.

De les diferents *Miniprep* seqüenciades on el vector havia incorporat la variant, es va escollir una per prosseguir amb el protocol. Es va raspar l'estoc de glicerol corresponent i es va deixar créixer en 4 mL de Brou LB+Amp durant 5-6 hores a 37 °C i a 220 rpm. Finalment, es va diluir el cultiu inicial en un Erlenmeyer amb 100 mL de Brou LB+Amp i es va deixar incubant O/N amb les condicions anteriors. Aquest cultiu es va utilitzar per fer una *MidiPrep*, d'aquesta manera es va obtenir més quantitat del vector amb la variant. Per realitzar la *MidiPrep* es va emprar el kit *QIAGEN Plasmid Midi* (QIAGEN (Hilden, Alemanya)), segons les especificacions del fabricant. El DNA obtingut es va quantificar utilitzant el NANODROP-1000.

4. Seqüenciació

4.1. BigDye

Un cop purificat el vector, la reacció de seqüenciació es va realitzar a partir del mètode Sanger amb el kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific). La composició de la mix es troba detallada a la Taula 11. Un cop preparada, es va repartir en una placa de 96 pous i es va sotmetre a un perfil de canvis de temperatura (Taula 12).

Taula 11. Reactius emprats per a la reacció de seqüenciació.

Component	Concentració final	Companyia
Tampó de Seqüenciació 5X	1X	Life Technologies-Thermo Fisher Scientific
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1X	Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific
Primer 10 µM	1 µM	N/A
H2O	N/A	N/A
Plasmidi purificat	50 ng/ µL	N/A

Taula 12. Perfil de temperatures al qual es va sotmetre la mix de la reacció de seqüenciació.

Temperatura	Duració	Cicles
96°C	1'	1
96°C	10"	25
50°C	5"	
60°C	4'	
4°C	∞	1

4.2. Precipitació

Per precipitar el producte de seqüenciació es van afegir 80 µL d'acetat de sodi (Sigma-Aldrich-Merck) per cada pou de la placa de 96-pous. Posteriorment, es va tapar amb un film adhesiu transparent (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific) i es va incubar durant 10' a la foscor. El següent pas va consistir en centrifugar la placa durant 45' a 2000 xg amb la centrífuga *Eppendorf® 5810R* (Eppendorf (Hamburg, Alemanya)). A continuació es va eliminar el líquid sacsejant la placa i centrifugant-la durant 6" boca avall, i es va deixar assecar durant 10' a la foscor sense tapar-la.

Tot seguit es van afegir 150 µL d'Etanol 70% (Scharlab,S.L. (Barcelona, Espanya)) i es va centrifugar 10' a 2000 xg. Un cop acabada la centrifugació es va tornar a repetir el mateix procediment d'assecat realitzat anteriorment. Per acabar, es van afegir 10 µL d'Hi-Di™ Formamida (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific) a cada pou, i es va cobrir la placa amb una tapa d'alumini (SARSTEDT AG & Co. KG) per incubar-la al termociclador *Veriti™ 7'* a 95 °C.

4.3. Anàlisi de les seqüències

Les dades resultants es van analitzar amb els software *Seqscape v7.0* (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific) i *Sequencing Analysis v.4.0* (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific). Les dades es varen comparar amb la seqüència de referència del gen *SCN5A* en humans.

5. Cultius cel·lulars de cèl·lules HEK-293T

Les cèl·lules HEK-293T es van mantenir rutinàriament. Pel passatge de les cèl·lules a un nou flascó de 25 cm² (Falcon-Corning), en primer lloc, es va aspirar el medi i rentar les cèl·lules PBS. A continuació, després d'aspirar el PBS es van afegir 200 µL de tripsina 0.05% (Sigma-Aldrich-Merck) i es va incubar 3' a 37°C.

Un cop incubat, es va afegir medi de treball de les HEK-293T (Taula 2) sobre la tripsina per tal de desenganxar les cèl·lules. Finalment, es van afegir 200-300 µL en un nou flascó amb 5 mL de medi.

Per realitzar els experiments de Western Blot de les variants, les cèl·lules es van sembrar en una placa de 6 pous (Falcon-Corning) en medi DMEM. En el cas de les cèl·lules per prosseguir amb el protocol d'immunofluorescència, es van sembrar en cobreobjectes coberts amb 500 µL de *Poly-L-lysine* (Sigma-Aldrich-Merck), situats dins d'una placa de 12 pous (Falcon-Corning).

6. Transfecció de cèl·lules HEK-293T

Per realitzar la transfecció en cèl·lules HEK-293T es van preparar dos tubs per cada condició:

- **Primer tub:** 250 µL d'Opti-MEM (Gibco-Thermo Fisher Scientific) + 4 µL de *Lipofectamine* - 2000 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific).
- **Segon tub:** 250 µL d'Opti-MEM + quantitat necessària de vector segons cada condició. També es va afegir vector GFP.

Les diferents condicions de transfecció que es van realitzar van ser: homozigosis del gen sense cap variant (Nav1.5^{WT}), homozigosis del gen amb la variant (Nav1.5^V) i heterozigosis (Nav1.5^{WT/V}). Aquestes transfeccions es van realitzar per triplicat per ambdues variants. (Taula 13)

Taula 13. Quantitat de vector utilitzat per a cada condició de les cèl·lules transfectades.

Condicció		Quantitat de vector utilitzat (µg)
Homozigot <i>Wild Type</i>	Nav1.5 ^{WT} + GFP	1.54 + 0.1
Heterozigot	Nav1.5 ^{WT/V} + GFP	0.77 + 0.77 + 0,1
Homozigot mutat	Nav1.5 ^V + GFP	1.54 + 0.1

En les transfeccions per l'estudi d'immunofluorescència no es va afegir GFP.

Un cop preparats els 2 tubs per a cada condició, es va afegir el contingut del Tub 2 al Tub 1 i es va incubar 7'. Mentrestant, es va renovar el medi de les cèl·lules. Finalment, es va distribuir gota a gota cada mix en un pou, i es va deixar incubar la placa a 37°C.

A les 24 hores següents es va canviar el medi de les plaques de 6 pous i a les 48h es va recollir el lisat tal i com s'explica a l'apartat 7, o es va prosseguir amb l'assaig d'immunofluorescència.

7. Western Blot

Les cèl·lules HEK-293T transfectades es van lissar utilitzant el tampó de lisis descrit a la Taula 3. En primer lloc, es va afegir el tampó de lisis al pou, i amb l'ajuda d'un raspador (Falcon-Corning) es van aixecar les cèl·lules del fons de la placa. A continuació es van transferir les HEK-293T en un tub d'1,5 mL i es van incubar durant 1 hora a 4°C en una noria giratòria (OVAN (Barcelona, Espanya)). Finalment, les mostres es van sonicar amb el *Sound dampening Chamber* (SB2) (Sartorius AG (Göttingen, Alemanya)).

Per quantificar les mostres es va utilitzar el kit *Pierce BCA protein assay* (Thermo Fisher Scientific) i una recta patró feta a partir d'Albúmina sèrica de boví (BSA) (Pierce Protein Biology-Thermo Fisher Scientific) en un rang de 0.5 a 7 µg. En una placa de 96 pous, es van afegir, per una banda, les solucions de la recta patró per duplicat. Per altra banda, el lisat diluït de les diferents condicions transfectades en cèl·lules HEK-293T per triplicat. A tots els pous s'hi va afegir 200 µL del reactiu de BCA del kit. La placa de 96 pous tapada amb film transparent es va incubar a 37°C durant 30'. A continuació es va llegir l'absorbància dels pous amb el *Microplate Reader: Cytation 5 Imaging Reader* (BioTek (Vermont, Estats Units)) i el *software Gen5* (BioTek) a una longitud d'ona de 562 nm.

A partir de les concentracions obtingudes es van preparar les mostres per separar les proteïnes per electroforesis en el gel SDS-PAGE fast-cast (Bio-Rad Laboratories). És important que al gel es carregui la mateixa quantitat de proteïna per cada mostra, ja que és necessari per a comparacions posteriors. Es va afegir a la mostra el volum corresponent de tampó de mostra 4x suplementat amb un 10% de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich-Merck). Tot seguit es va afegir tampó d'electròlisi suficient per a obtenir el mateix volum final a totes les mostres. Les mostres es van bullir a 95°C durant 5' al termobloc *TS1 ThermoShaker* i es van carregar al gel, juntament amb 20 µL del marcador de pes molecular *Blue Star Plus Prestained Protein Marker* (NIPPON Genetic EUROPE GmbH (Düren, Alemanya)).

El voltatge es va aplicar al gel en dues etapes diferents, els primers 10' es va utilitzar un voltatge de 100 V fins que el front blau va arribar al final del gel apilador. A continuació, es va incrementar

el voltatge entre 160-180 V fins que el front blau va sobresortir per la part de baix del gel. Un cop separades les proteïnes, el gel es va activar amb el *ChemiDoc Imaging System* (Bior-Rad Laboratories) en el mode *Stain-free gel*.

A continuació es va realitzar la transferència de les proteïnes del gel a una membrana PVDF (GE Healthcare Life Sciences (Illinois, Estats Units)). En primer lloc, es va activar la membrana PVDF, posant-la en remull durant 10" en metanol (Scharlab,S.L.), 10" en aigua mQ per duplicat, i finalment 10' en tampó de transferència + 20% metanol. Simultàniament, es va rentar el gel en agitació durant 15' en tampó de transferència + 20% metanol.

El següent pas va consistir en muntar la transferència, es van requerir 6 retalls de paper de filtre (Avantor (Pennsilvània, Estats Units)), dues esponges de fibra, el gel i la membrana. La transferència es va realitzar en tampó de transferència amb 4 mL d' SDS a 90 V durant dues hores a la cambra freda.

Un cop realitzada la transferència es va realitzar una fotografia de la membrana amb el *ChemiDoc Imaging System* amb el mode *Stain-free blot*.

Posteriorment, es va bloquejar la membrana amb llet desnatada en pols (Scharlab,S.L.) al 5% diluïda en PBS amb 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich-Merck) (PBS-T) durant 1 hora a RT. Totes les incubacions de la membrana realitzades a continuació es varen dur a terme en agitació a baixa velocitat amb l'agitador de plataforma *Heidolph Duomax 1030* (Heidolph (Schwabach, Alemanya)). Finalment, es va incubar la membrana amb l'anticòs primari policlonal de *rabbit anti-Na_v1.5* 1:10000, O/N a 4°C.

A continuació, es va rentar la membrana dues vegades amb PBS-T durant 5' en agitació suau, seguit de dos rentats més amb PBS. Posteriorment, la membrana es va incubar a temperatura ambient (RT) durant 1 hora amb l'anticòs secundari *goat anti-rabbit*, diluït 1:10000 en una solució al 3% de llet desnatada en pols en PBS-T.

Finalment es va tornar a rentar la membrana 5' en agitació amb PBS-T per duplicat, i 5' amb PBS també per duplicat. Per revelar la membrana es va utilitzar el kit *Clarity: Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories) i es va realitzar una fotografia de la membrana amb el *ChemiDoc Imaging System* amb el mode Quimioluminescent i colorimètric.

Els valors de la intensitat de la membrana per cada mostra van ser normalitzats per la densitat total de cada línia de la membrana després de la transferència de les proteïnes. També es va normalitzar la intensitat de la membrana respecte la mitjana de la densitat de totes les línies d'una mateixa membrana. Aquest procediment s'ha realitzat amb el software ImageLab (Bio-Rad Laboratories).

Per cada transfecció es van realitzar 3 replicats tècnics.

8. Immunofluorescència

Les cèl·lules transfectades a la placa de 12 pous es van rentar per duplicat amb PBS, en gel. A continuació es va afegir la solució de fixació i es va deixar incubar 20' a RT. Un cop acabada la incubació, es va aspirar la solució de fixació i es va aturar la reacció amb la solució de *Quenching* incubant la placa durant 10' a RT. El següent pas va consistir en rentar tres vegades amb PBS els pous. A continuació es va afegir la solució de bloqueig i permeabilitzant (PFS), i es va incubar durant 30' a 37°C. Un cop passats els 30' es van realitzar 3 rentats amb PBS. Finalment, es va deixar incubar O/N a 4°C amb l'anticòs primari policlonal de *rabbit anti-Na_v1.5* 1:1000 en una cambra fosca feta a mà.

L'endemà, es van rentar els cobreobjectes (Thermo Fisher Scientific) amb PFS quatre vegades deixant incubar 5' entre rentats. A continuació es va afegir l'anticòs secundari α -Rb 488 1:1000 i es van deixar incubar a la foscor durant 1 hora. Transcorregut aquest temps es van rentar 3 vegades els cobreobjectes amb PFS. El següent pas va consistir en afegir DAPI (Sigma-Aldrich-Merck), a una concentració de 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, amb PBS i es va incubar 5' a RT a la foscor. Quan la incubació va finalitzar es van rentar dues vegades amb PBS.

Per acabar es va realitzar el muntatge del portaobjectes (Thermo Fisher Scientific) amb el cobreobjectes. En primer lloc, es van rentar els cobreobjectes amb aigua mQ i es va assecar l'excés amb paper absorbent. A continuació es va afegir una gota del medi d'assemblatge *FluorSaveTM* (Sigma-Aldrich-Merck) sobre el portaobjectes i es va colorar el cobreobjectes sobre la gota del medi d'assemblatge. Finalment, es va incubar O/N a RT i es va fixar amb esmalt d'ungles transparent (Yesensy (Madrid, Espanya)).

Es van observar les mostres en el Microscopi de fluorescència Y-TVSS (Nikon (Tokio, Japó)) amb l'augment 60X, per aquest motiu es va utilitzar oli d'immersió (Sigma-Aldrich-Merck). Es va fotografiar les cèl·lules amb la càmera Digital Sight (Nikon) amb llum blanca, fluorescència verda i blava.

9. Anàlisi estadístic

La normalitat de les dades es va verificar mitjançant el test de Shapiro-Wilk. Per la comparació estadística dels resultats dels assajos de Western Blot per ambdues variants es va emprar el test paramètric t-test.

Les diferències es van considerar estadísticament significatives quan el valor p era menor de 0.05 ($p < 0.05$).

S'ha utilitzat el programa *Origin 2016* (OriginLab Corporation (Massachusetts, Estats Units)) per a realitzar l'anàlisi estadístic del treball.

IV RESULTATS

Obtenció dels vectors d'expressió que contenen les dues variants d'estudi

Vam utilitzar el vector pcDNA3.1-SCN5A per introduir cadascuna de les dues variants a partir de mutagènesi dirigida. A continuació, vam transformar cèl·lules d'E.coli DH5 α amb cadascun dels dos productes de la reacció de mutagènesi per separat. Finalment, vam purificar els vectors de diferents colònies i els vam seqüenciar per verificar la presència de la variant i l'absència de variants no desitjades.

Per la primera variant vam obtenir el vector que contenia la variant SCN5A_c.2302A>G, però també altres vectors que en seqüenciar no havien introduït el canvi del nucleòtid G per A en la posició 2302, sinó que romanien WT (Figura 10). L'eficiència de la mutagènesi que es va obtenir va ser d'un 67%, ja que d'un total de 6 colònies totals 4 estaven mutades, 1 presentava un genotip WT i la colònia restant no presentava el fragment d'interès.

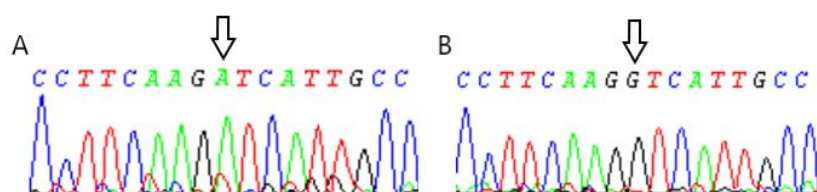


Figura 10. A: Cromatograma de la seqüència d'un vector que no ha introduït la variant (WT). B: Cromatograma de la seqüència d'un vector que ha introduït la variant SCN5A_c.2302A>G.

Per la segona variant vam obtenir vectors d'expressió que en seqüenciar no havien introduït el canvi d'una C per una T en la posició 2332 i altres que sí que contenen la variant SCN5A_c.2332C>T (Figura 11). D'un total de 10 colònies, només 3 contenen la variant, 1 presentava un genotip WT i les 6 restants no presentaven el fragment d'interès. Per tant, l'eficiència de la mutagènesi per la variant SCN5A_c.2332C>T obtinguda ha estat d'un 30%.

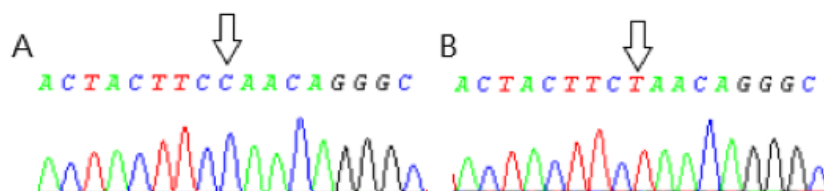


Figura 11. A: Cromatograma de la seqüència d'un vector que no ha introduït la variant (WT). B: Cromatograma de la seqüència d'un vector que ha introduït la variant SCN5A_c.2332C>T.

Variació de l'expressió de la proteïna Na_v1.5 en cèl·lules HEK-293T transfectades

Per tal de determinar com varia l'expressió de Na_v1.5 amb les variants expressades en heterozigosis i homozigosis, vam realitzar assajos de Western Blot a partir de cèl·lules HEK-293T, 48h després de ser transfectades, amb un anticòs anti-Na_v1.5 a una dilució 1:10000. Les 4 condicions de treball van ser: Na_v1.5^{WT}, Na_v1.5^{WT/V}, Na_v1.5^V i el control (CTRL). Vam realitzar tres replicats biològics, és a dir 3 transfeccions diferents, i tres replicats tècnics per cada replicat biològic.

En el revelat de la membrana de les diferents condicions de la variant I768V, s'observa que la banda per la condició d'heterozigosi ($\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}/\text{I768V}}$) és menys intensa que la banda que s'obté per la condició $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}}$. A més a més, en la condició d'homozigosi per la variant ($\text{Nav}_v1.5^{\text{I768V}}$) no s'observa banda (Figura 12A).

Un cop quantificada la intensitat de les bandes utilitzant el programa ImageLab, s'observa que l'expressió del canal de sodi cardíac disminueix aproximadament un $56\% \pm 0,043$ en la condició amb la variant en heterozigosi, respecte de l'expressió que s'obté en les cèl·lules transfectades amb $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}}$. D'altra banda, en les cèl·lules transfectades amb la variant $\text{Nav}_v1.5^{\text{I768V}}$ en homozigosi, no es va poder realitzar la quantificació perquè no hi havia expressió de la proteïna (Figura 12C).

La disminució de l'expressió en $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}/\text{I768V}}$ respecte $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}}$ és significativa, ja que el valor p és inferior a 0.05 (valor $p < 0.05$).

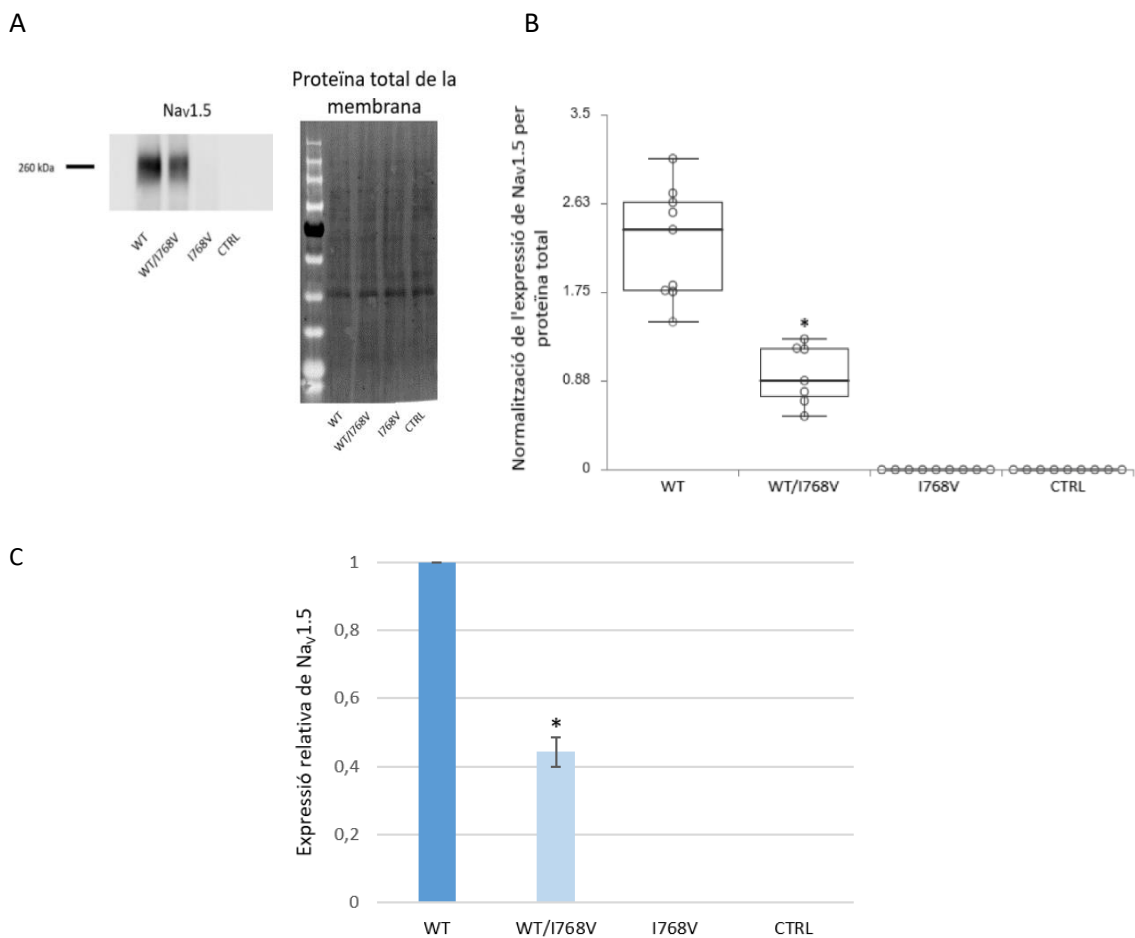


Figura 12. **A, esquerra:** Detecció de $\text{Nav}_v1.5$ en el Western Blot **A, dreta:** Proteïna total de la membrana del Western Blot després de la transferència. **B:** Normalització de la intensitat de la banda corresponent a $\text{Nav}_v1.5$ per la proteïna total, i per la mitjana de la proteïna total de totes les mostres presents a la membrana. **C:** Normalització de les condicions respecte $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}}$. N=9 *valor $p < 0.05$

Amb relació al revelat de la membrana de les diferents condicions de la variant $\text{Nav}_v1.5_{\text{p.Q778X}}$, en primer lloc s'observa que per la condició d'homozigosi de la variant ($\text{Nav}_v1.5^{\text{Q778X}}$) no hi ha banda. En les altres dues condicions WT ($\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}}$) i heterozigosi ($\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}/\text{Q778X}}$) sí que s'observa banda d'expressió. Tot i això, la banda de $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}/\text{Q778X}}$ té menys intensitat que la $\text{Nav}_v1.5^{\text{WT}}$ (Figura 13A).

En normalitzar la intensitat de les bandes obtingudes a partir d'ImageLab per la intensitat de $\text{Na}_v1.5^{\text{WT}}$, l'expressió de canal de sodi cardíac en cèl·lules HEK-293T transfectades amb $\text{Na}_v1.5^{\text{WT}/\text{Q778X}}$ disminueix aproximadament fins a un $47\% \pm 0,075$ respecte la condició WT (Figura 13C). La disminució de l'expressió en $\text{Na}_v1.5^{\text{WT}/\text{Q778X}}$ respecte $\text{Na}_v1.5^{\text{WT}}$ és significativa, ja que el valor p és inferior a 0.05 (valor $p < 0.05$). D'altra banda, s'observa que en la condició $\text{Na}_v1.5^{\text{Q778X}}$ no hi ha expressió del canal de sodi cardíac.

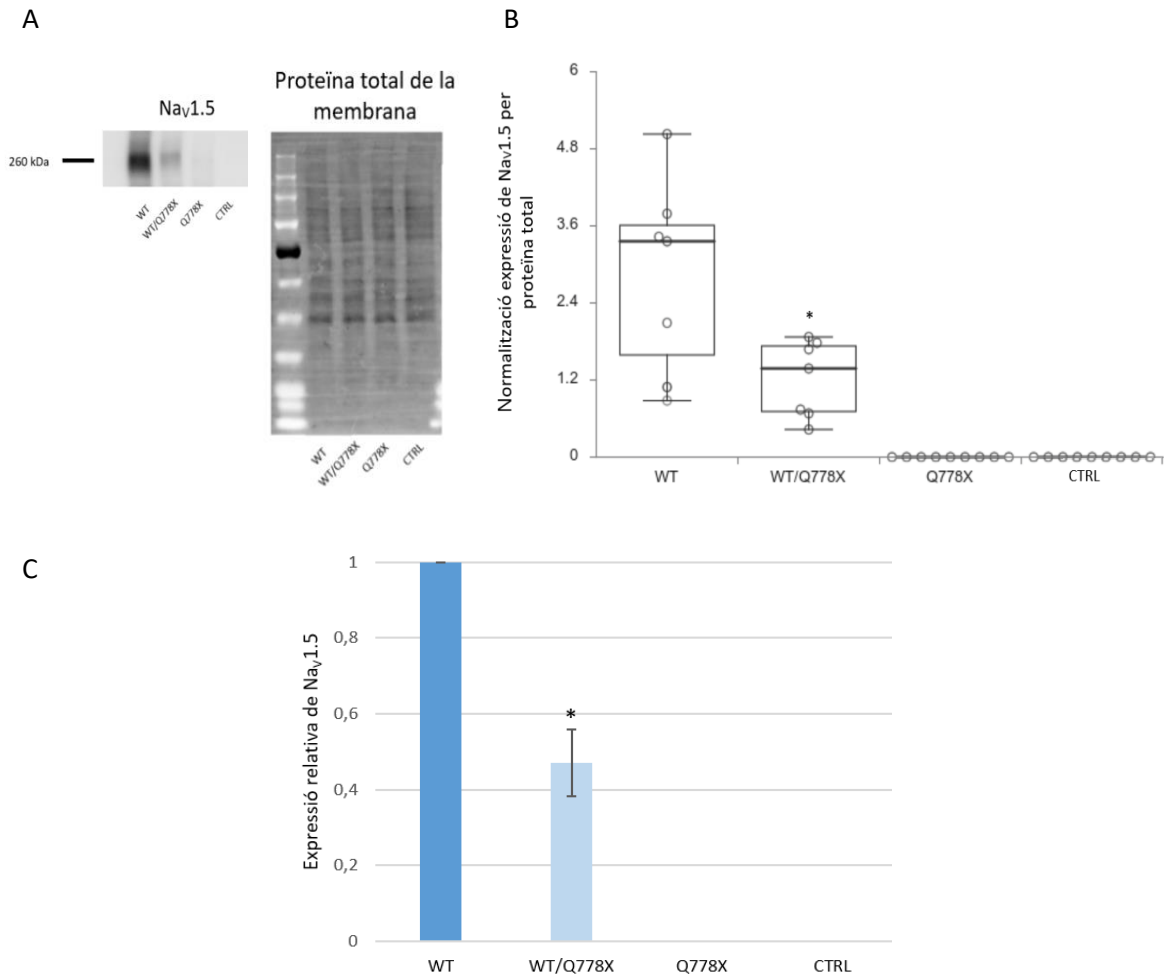


Figura 13. A, esquerra: Detecció de $\text{Na}_v1.5$ en el Western Blot **A, dreta:** Proteïna total de la membrana del Western Blot després de la transferència. **B:** Normalització de la intensitat de la banda corresponent a $\text{Na}_v1.5$ per la proteïna total, i per la mitjana de la proteïna total de totes les mostres presents a la membrana. **C:** Normalització de les condicions respecte $\text{Na}_v1.5^{\text{WT}}$. $N=9$. S'han descartat dos valors de la condició WT i dos més de WT/Q778X. *valor $p < 0.05$

Localització de Nav1.5 en cèl·lules HEK-293T transfectades

Per tal d'observar quin efecte té cadascuna de les variants estudiades sobre la localització de Nav1.5 vam realitzar assajos d'immunofluorescència a partir de cèl·lules HEK-293T transfectades, utilitzant un anticòs anti-Nav1.5 1:1000. Les 4 condicions de treball van ser: Nav1.5^{WT}, Nav1.5^{WT/V}, Nav1.5^V i CTRL per a les dues variants.

En primer lloc, en la Figura 14 podem observar les diferents imatges obtingudes amb el microscopi de fluorescència de les mostres de l'experiment d'immunofluorescència per la variant Nav1.5_p.I768V. En les cèl·lules transfectades amb Nav1.5^{WT} s'observa una fluorescència principalment localitzada en la membrana de les cèl·lules. En aquelles cèl·lules transfectades amb Nav1.5^{WT/I768V} s'intueix fluorescència en la membrana i també en el citoplasma. Finalment, aquelles cèl·lules transfectades amb Nav1.5^{I768V} es pot intuir que presenten una fluorescència menys intensa i localitzada en el citoplasma i la membrana de les cèl·lules.

En comparar la quantitat de cèl·lules transfectades amb marcatge positiu per Nav1.5 amb les cèl·lules totals de la imatge, s'observa una disminució de cèl·lules positives en Nav1.5^{I768V} en comparació amb les altres condicions.

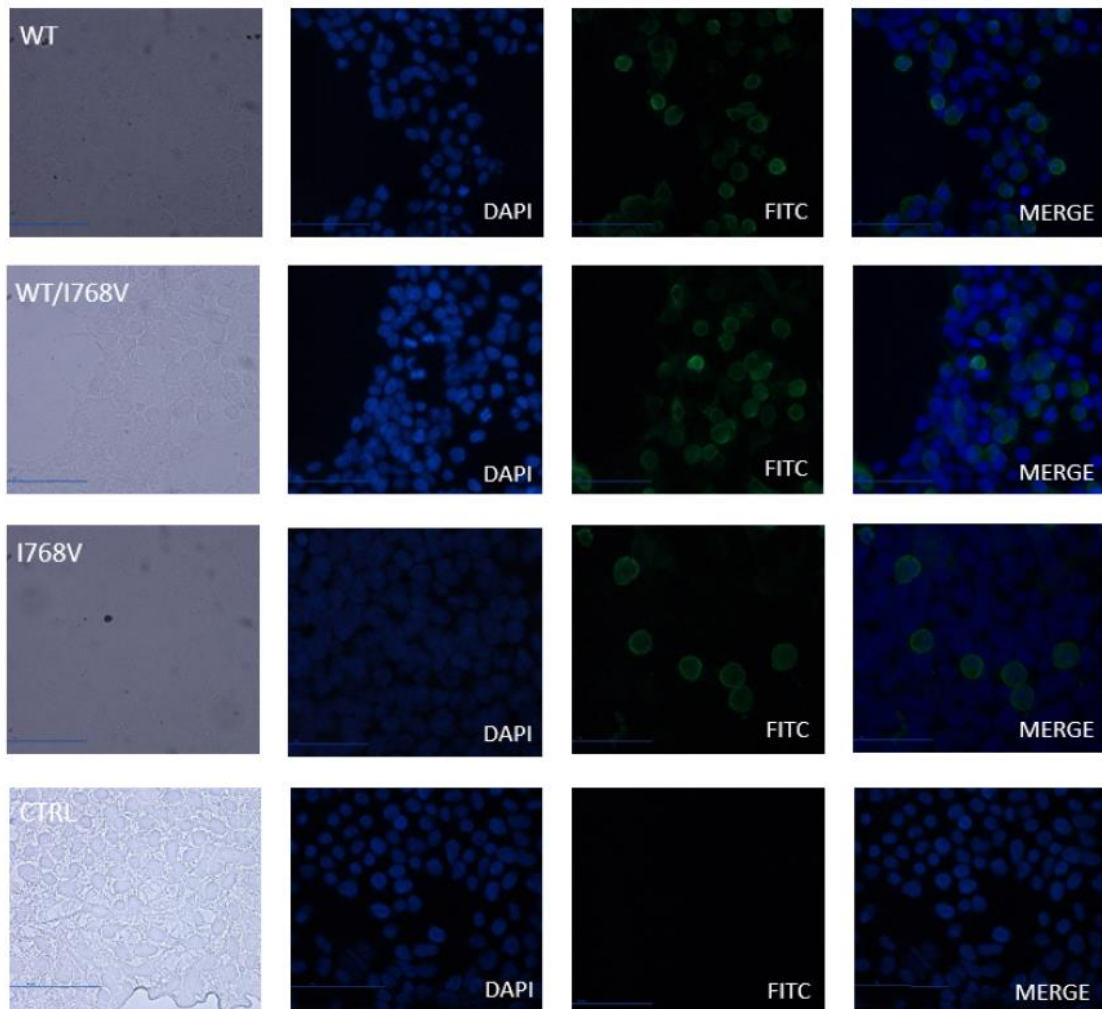


Figura 14. Assaig d'Immunofluorescència de la variant Nav1.5_p.I768V per les condicions, de dalt a baix, Nav1.5^{WT}, Nav1.5^{WT/I768V}, Nav1.5^{I768V} i CTRL. Columnes d'esquerra a dreta: *brightfield*, marcatge del nucli (DAPI), marcatge de Nav1.5 (FITC), *merge* de DAPI i FITC.

En la Figura 15 podem observar les diferents imatges obtingudes amb el microscopi de fluorescència de les mostres de l'experiment d'immunofluorescència per la variant Nav1.5_p.Q778X.

En les cèl·lules transfectades amb Nav1.5^{WT} s'intueix que la fluorescència està principalment en la membrana cel·lular. En aquelles transfectades amb Nav1.5^{WT/Q778X} sembla que la fluorescència no està tant definida a la membrana sinó que també es pot apreciar en el citoplasma. Finalment, aquelles cèl·lules transfectades amb Nav1.5^{Q778X} es podria intuir que la localització de la proteïna té lloc arreu del citoplasma de les cèl·lules

En comparar la quantitat de cèl·lules transfectades amb marcatge positiu per Nav1.5 amb les cèl·lules totals de la imatge, s'observa una disminució de cèl·lules positives en Nav1.5^{Q778X} en comparació amb les altres condicions.

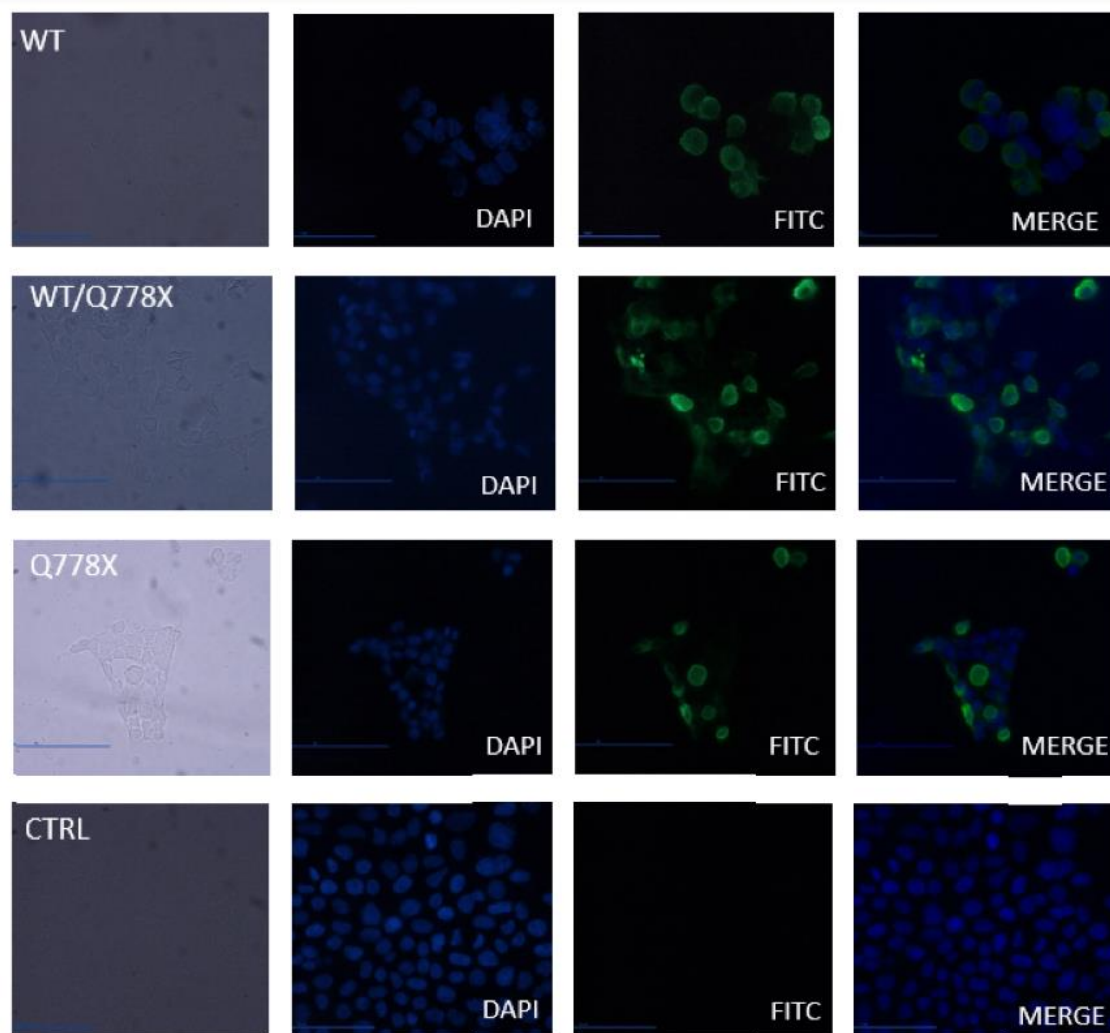


Figura 15. Assaig d'Immunofluorescència de la variant Nav1.5_p.Q778X per les condicions, de dalt a baix, Nav1.5^{WT}, Nav1.5^{WT/Q778X}, Nav1.5^{Q778X} i CTRL. Columnes d'esquerra a dreta: *brightfield*, marcatge del nucli (DAPI), marcatge de Nav1.5 (FITC), *merge* de DAPI i FITC.

V DISSCUSIÓ

Per determinar quin efecte tenen sobre el canal de sodi cardíac $Na_v1.5$ les variants de significat incert, trobades en pacients amb SBr, que s'han estudiat en aquest treball de final de grau, se'n va determinar l'expressió i localització en presència de les variants en cèl·lules HEK-293T transfectades. Es van estudiar com afectaven les variants tant en heterozigosis com en homozigosis, en comparació a la condició WT.

$Na_v1.5$ p.I768V

En primer lloc, s'ha observat que la variant $Na_v1.5$ _p.I768V quan es troba en heterozigosis disminueix l'expressió del canal de sodi cardíac significativament en un 44% en comparació amb la forma WT, i que en homozigosis no s'expressa la proteïna. Però en realitzar l'assaig d'immunofluorescència es va observar fluorescència en les HEK-293T transfectades amb $Na_v1.5$ ^{I768V}.

Al realitzar l'experiment de Western Blot, es va emprar una dilució de l'anticòs d'1:10000; d'altra banda, la dilució de l'anticòs en els assajos de Immunofluorescència era de 1:1000. Podria ser que la quantitat de proteïna $Na_v1.5$ en la condició homozigota fos molt baixa i per aquest motiu una dilució d'anticòs 1:10000 fos massa gran per poder observar una banda en el revelat de la membrana del Western Blot. A més a més, cal tenir en compte que la sensibilitat de les dues tècniques és diferent. També podríem relacionar els resultats obtinguts amb la disminució de quantitat de cèl·lules transfectades amb marcatge positiu en comparació de les cèl·lules totals de la mostra en aquesta condició envers les altres condicions, fet que es tradueix en una quantitat final de proteïna $Na_v1.5$ menor. Per tant, com que la immunofluorescència és més sensible i s'observen menys cèl·lules amb marcatge positiu en $Na_v1.5$, podria ser que la dilució tant elevada de l'anticòs utilitzada en el Western Blot impossibiliti detecció de la banda.

Seguint la predicció de l'eina PolyPhen-2, la variant $Na_v1.5$ _p.I768V s'esperava que fos benigne i no tingués un efecte sobre $Na_v1.5$. Tot i així, els resultats obtinguts demostren el contrari, posant en evidència la importància de comprovar experimentalment les prediccions obtingudes mitjançant aquestes eines.

S'han reportat altres variants que afecten al mateix aminoàcid, encara que no han estat caracteritzades, com ara $Na_v1.5$ _p.I768F, $Na_v1.5$ _p.I768S, $Na_v1.5$ _p.I768T, $Na_v1.5$ _p.I768M o $Na_v1.5$ _p.I768N (<https://variantbrowser.org/SCN5A/>). Totes aquestes variants s'han trobat en pacients que tenen SBr, i en d'altres que només en són portadors sans. Aquest fet posa de manifest la importància de la conservació de l'aminoàcid en aquesta posició.

$Na_v1.5$ p.Q778X

En els estudis realitzats per la variant $Na_v1.5$ _p.Q778X s'ha observat una disminució significativa de l'expressió del canal de sodi cardíac en la condició $Na_v1.5$ ^{WT/Q778X} en comparació a $Na_v1.5$ ^{WT}. Per $Na_v1.5$ ^{Q778X} no s'ha observat expressió de la proteïna d'estudi. Tot i així, es va observar fluorescència en $Na_v1.5$ ^{Q778X} en l'assaig d'immunofluorescència. Podria ser que la sensibilitat del Western Blot no fos suficient per detectar molt poca quantitat de $Na_v1.5$.

Al ser una proteïna truncada en l'aminoàcid 778 d'un total de 2015, el seu pes molecular disminuiria entre 75 i 100 kDa aproximadament. En la revelat del Western Blot també s'ha buscat una banda corresponent a la proteïna truncada, però no s'ha identificat.

Aquesta variant no s'ha descrit ni caracteritzat amb anterioritat, però si altres variants pròximes situades en el *loop* entre S2 i S3 del DII, que també introdueixen un codó *stop*, provocant que la

proteïna quedi truncada, com Nav1.5_p.Q779X i la Nav1.5_p.W781X (<https://variantbrowser.org/SCN5A/>).

La variant Nav1.5_p.Q779X té una penetrància d'un 56% en SBr i es va descriure per primer cop en un pacient de 13 anys diagnosticat amb SBr. Els familiars portadors de la variant també van mostrar alteracions en el segment ST de l'ECG després d'administrar pilsicainida. Es va determinar que Nav1.5_p.Q779X comportava una pèrdua de funció del canal, i que conjuntament amb altres variants en els gens *SCN1B* i *DSG2* podrien explicar la diferència de fenotips entre els portadors de la variant Nav1.5_p.Q779X. (42)

D'altra banda, Nav1.5_p.W781X té una penetrància del 55% en BrS i es va descriure per primer cop en una família caracteritzada per una gran heterogeneïtat fenotípica i una resposta maligna envers l'ajmalina. (44)

Discussió general

Per les dues variants estudiades, s'ha observat que l'expressió de la proteïna Nav1.5 també té lloc al citoplasma, a part de en la membrana cel·lular. Per a que tingui lloc una correcta contracció del múscul cardíac és de vital importància que el canal de sodi cardíac es trobi en la membrana, ja que d'aquesta manera garanteix una resposta al potencial d'acció. Al disminuir la quantitat de Nav1.5 en la membrana també s'estaria reduint la correcta despolarització de les cèl·lules cardíques.

Finalment, per comprendre millor com les variants estudiades Nav1.5_p.I768V i Nav1.5_p.Q778X poden ser les responsables o contribuir al fenotip de la SBr dels pacients on s'han trobat caldria realitzar estudis d'electrofisiologia. Un exemple seria la tècnica *Patch Clamp*, ja que en aquest treball no s'està posant a prova la funcionalitat elèctrica dels canals, fet que podria ajudar a comprendre millor l'efecte d'aquestes variants.

També convindria realitzar l'estudi de l'expressió en un model cel·lular que contingui el *background* genètic dels pacients, com els cardiomiòcits derivats de cèl·lules pluripotents. Tal i com s'ha comentat en la introducció, la majoria de les variants associades a SBr tenen una penetrància incompleta i una expressivitat variable, i determinants genètics i ambientals influeixen en les manifestacions fenotípiques.

VI CONCLUSIONS

The main conclusions obtained in this final degree thesis are:

- The Nav1.5_p.I768V variant decreases cardiac sodium channel expression by approximately 44% in heterozygously transfected HEK-293T cells, compared to the WT expression.
- The Nav1.5_p.I768V variant abolished Nav1.5 expression in the homozygosis condition, compared to the WT in HEK-293T cells.
- Nav1.5 localization is abundantly observed in the cell cytoplasm in those HEK-293T cells transfected with Nav1.5^{I768V}. Nav1.5 is observed both in the cytoplasm and the membrane of cells transfected with Nav1.5^{WT/I768V}.
- The Nav1.5_p.Q778X variant decreases cardiac sodium channel expression by approximately 47% in HEK-293T cells transfected in heterozygous form, compared to the WT expression.
- The Nav1.5_p.Q778X variant abolished Nav1.5 expression in homozygosis, compared to the WT in transfected HEK-293T cells.
- Nav1.5 localization is observed not only throughout the cell membrane, it can also be observed in the cell cytoplasm of HEK-293T cells transfected with Nav1.5^{Q778X} and Nav1.5^{WT/Q778X}.
- Further studies would need to be performed to fully determine whether the Nav1.5_p.I768V and Nav1.5_p.Q778X study variants contribute to or are responsible for the Brugada syndrome phenotype in the patients where they have been identified.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Martinez Moreno R. Effect of sodium channel SNVs associated to arrhythmogenic diseases. Modulatory role of the genetic background. [Internet]. Universitat de Girona; 2021. Disponible a: <http://hdl.handle.net/10803/672837>
2. Sendfeld, Selga, Scornik, Pérez, Mills, Brugada. Experimental Models of Brugada syndrome. Int J Mol Sci [Internet]. 29 abril 2019;20(9):2123. Disponible a: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2123>
3. Veerman CC, Kosmidis G, Mummery CL, Casini S, Verkerk AO, Bellin M. Immaturity of Human Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes in Culture: Fatal Flaw or Soluble Problem? Stem Cells Dev [Internet]. maig 2015;24(9):1035-52. Disponible a: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014.0533>
4. Alconero Camarero AR. Alerta ante los síntomas previos al infarto de miocardio en la mujer. Nuberos Científica [Internet]. 2010;1. Disponible a: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7579266>
5. Mosca L, Barrett-Connor E, Kass Wenger N. Sex/Gender Differences in Cardiovascular Disease Prevention. Circulation [Internet]. 8 novembre 2011;124(19):2145-54. Disponible a: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.968792>
6. Barretina J. Codi de Bones Pràctiques en la recerca per als professionals de l'IDIBGI [Internet]. 2016. Disponible a: <https://idibgi.org/wp-content/uploads/2022/11/IDI-DOC-001-Codi-de-bones-practiques-en-la-recerca.pdf>
7. Virmani R, Burke AP, Farb A. Sudden cardiac death. Cardiovascular Pathology [Internet]. setembre 2001;10(5):211-8. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054880701000916>
8. Adabag AS, Luepker R V., Roger VL, Gersh BJ. Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. Nat Rev Cardiol [Internet]. 9 abril 2010;7(4):216-25. Disponible a: <https://www.nature.com/articles/nrcardio.2010.3>
9. Deo R, Albert CM. Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death. Circulation [Internet]. 31 gener 2012;125(4):620-37. Disponible a: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.023838>
10. ¿Qué es la miocardiopatía? [Internet]. National Heart, Lung and Blood Institute. 2022. Disponible a: <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/miocardiopatia>
11. Kim JB. Channelopathies. Korean J Pediatr [Internet]. 2014;57(1):1. Disponible a: <http://www.e-cep.org/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2014.57.1.1>
12. Behere S, Weindling S. Inherited arrhythmias: The cardiac channelopathies. Ann Pediatr Cardiol [Internet]. 1 setembre 2015;8(3):210. Disponible a: <https://journals.lww.com/10.4103/0974-2069.164695>

13. Goldenberg I, Zareba W, Moss AJ. Long QT Syndrome. *Curr Probl Cardiol* [Internet]. noviembre 2008;33(11):629-94. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146280608001230>
14. Brugada R, Hong K, Cordeiro JM, Dumaine R. Short QT syndrome. *Can Med Assoc J* [Internet]. 22 noviembre 2005;173(11):1349-54. Disponible a: <http://www.cmaj.ca/cgi/doi/10.1503/cmaj.050596>
15. Napolitano C, Mazzanti A, Bloise R, Priori SG. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia [Internet]. *GeneReviews*®. 1993. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823244>
16. Lozano JA. Arritmias-y-su-tratamiento. 2001; 11:96-105. Disponible a: <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=13023366&r=4>
17. De Jesús Perez JJ. Propagación del potencial de acción en células cardíacas [Internet]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2012. Disponible a: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1168
18. Hernandez-Padilla J. Electrocardiografía básica. En 2016. p. 85-92.
19. Electrocardiograma [Internet]. Instituto Nacional del Cancer. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/electrocardiograma>
20. Marbán E. Cardiac channelopathies. *Nature* [Internet]. gener 2002;415(6868):213-8. Disponible a: <https://www.nature.com/articles/415213a>
21. Davis D. Interpretación del ECG. Su dominio rápido y exacto. 4a ed. Editorial Medica Panamericana; 2007.
22. Sörnmo L, Laguna P. Electrocardiogram (ECG) signal processing. *Wiley encyclopedia of biomedical engineering* [Internet]. 2006; Disponible a: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=941a668cb77010e032a809861427fa8b1bee8ea0>
23. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational Research* [Internet]. gener 2013;161(1):1-14. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193152441200299X>
24. Bartolini E, Camprostrini R, Kiferle L, Pradella S, Rosati E, Chinthapalli K, et al. Epilepsy and brain channelopathies from infancy to adulthood. *Neurological Sciences* [Internet]. 14 abril 2020;41(4):749-61. Disponible a: <http://link.springer.com/10.1007/s10072-019-04190-x>
25. Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* [Internet]. maig 1998;508(3):647-57. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.1998.647bp.x>
26. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp Physiol* [Internet]. 1 gener 2014;99(1):35-51. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2013.071969>

27. Bertrand D, Biton B, Licher T, Chambard J, Lanneau C, Partiseti M, et al. Functional Studies of Sodium Channels: From Target to Compound Identification. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 13 desembre 2016;75(1):9.21.1-9.21.35. Disponible a: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpph.14>
28. Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MFA. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1 gener 2012;93(1):12-23. Disponible a: <https://academic.oup.com/cardiavasres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvr252>
29. Veerman CC, Wilde AAM, Lodder EM. The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product Nav1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene* [Internet]. 1 desembre 2015;573(2):177-87. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111915010604>
30. Campuzano O, Beltrán-Álvarez P, Iglesias A, Scornik F, Pérez G, Brugada R. Genetics and cardiac channelopathies. *Genetics in Medicine* [Internet]. maig 2010;12(5):260-7. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021015458>
31. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: A distinct clinical and electrocardiographic syndrome. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. novembre 1992;20(6):1391-6. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/073510979290253J>
32. Sieira J, Brugada P. The definition of the Brugada syndrome. *Eur Heart J* [Internet]. 21 octubre 2017;38(40):3029-34. Disponible a: <http://academic.oup.com/eurheartj/article/38/40/3029/4101440>
33. Veerakul G, Nademanee K. Brugada Syndrome. *Circulation Journal* [Internet]. 2012;76(12):2713-22. Disponible a: https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/76/12/76_CJ-12-1352/article
34. Benito B, Sarkozy A, Mont L, Henkens S, Berruezo A, Tamborero D, et al. Gender Differences in Clinical Manifestations of Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 4 novembre 2008;52(19):1567-73. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109708027630>
35. Li A, Saba MM, Behr ER. Genetic biomarkers in Brugada syndrome. *Biomark Med* [Internet]. agost 2013;7(4):535-46. Disponible a: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm.13.78>
36. Rodríguez Muñoz D, del Val Martín D, Zamorano Gómez JL. Síndrome de Brugada. *Revista de la educación superior* [Internet]. 2017;12(38):2282-5. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2017.07.004>
37. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, et al. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* [Internet]. gener 2010;7(1):33-46. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1547527109011424>

38. Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Arbelo E, Brugada J, Brugada R. Brugada syndrome: clinical and genetic findings. *Genetics in Medicine* [Internet]. gener 2016;18(1):3-12. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021042994>
39. Remme CA, Verkerk AO, Nuyens D, van Ginneken ACG, van Brunschot S, Belterman CNW, et al. Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human *SCN5A* -1795insD. *Circulation* [Internet]. 12 desembre 2006;114(24):2584-94. Disponible a: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653949>
40. Park DS, Cerrone M, Morley G, Vasquez C, Fowler S, Liu N, et al. Genetically engineered *SCN5A* mutant pig hearts exhibit conduction defects and arrhythmias. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2 gener 2015;125(1):403-12. Disponible a: <http://www.jci.org/articles/view/76919>
41. NISHIDA K, FUJIKI A, MIZUMAKI K, SAKABE M, SUGAO M, TSUNEDA T, et al. Canine Model of Brugada Syndrome Using Regional Epicardial Cooling of the Right Ventricular Outflow Tract. *J Cardiovasc Electrophysiol* [Internet]. 24 agost 2004;15(8):936-41. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1540-8167.2004.04041.x>
42. Aoki H, Nakamura Y, Ohno S, Makiyama T, Horie M. Cardiac conduction defects and Brugada syndrome: A family with overlap syndrome carrying a nonsense *SCN5A* mutation. *J Arrhythm* [Internet]. febrer 2017;33(1):35-9. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.joa.2016.05.007>
43. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers [Internet]. Wilmintong; Disponible a: www.nanodrop.com
44. Gandjbakhch E, Fressart V, Duthoit G, Marquié C, Deharo JC, Pousset F, et al. Malignant response to ajmaline challenge in *SCN5A* mutation carriers: Experience from a large familial study. *Int J Cardiol* [Internet]. 1 març 2014;172(1):256-8. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.269>