

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELLA TESI

**MODELLI MATEMATICI DI POTENZIALE  
D'AZIONE ATRIALE UMANO E ANALISI  
DEGLI EFFETTI DI MALATTIE  
GENETICHE ARITMOGENE**

Tesi in

Bioingegneria Molecolare e Cellulare LM

Relatore  
Prof. Stefano Severi

Presentata da  
Matteo Fantini

Correlatore  
Dott. Andrea Barbuti

Sessione III

Anno Accademico 2012-2013



# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>VII</b>
<b>Obiettivi</b>	<b>XI</b>
<b>1 Il tessuto atriale</b>	<b>1</b>
1.1 Il cuore . . . . .	1
1.2 Tessuto specializzato e non specializzato . . . . .	3
1.2.1 Miociti atriali di lavoro . . . . .	4
1.2.2 Miociti atriali nodali . . . . .	6
1.3 Il potenziale d'azione atriale . . . . .	8
1.3.1 Potenziale d'azione delle cellule non specializzate . . . . .	11
1.3.1.1 Correnti entranti depolarizzanti ( $\text{Na}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ ) . . . . .	13
1.3.1.2 Correnti uscenti ripolarizzanti ( $\text{K}^+$ ) . . . . .	14
1.3.1.3 Altri canali ionici . . . . .	15
1.3.1.4 Pompe e scambiatori elettrogenici . . . . .	15
1.3.1.5 Dinamica del calcio intracellulare $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .	16
1.3.2 Potenziale d'azione pacemaker . . . . .	18
1.3.2.1 Corrente <i>funny</i> . . . . .	20
1.3.2.2 Correnti entranti depolarizzanti ( $\text{Na}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ ) . . . . .	21
1.3.2.3 Correnti uscenti ripolarizzanti ( $\text{K}^+$ ) . . . . .	21

---

1.3.2.4	Pompe e scambiatori elettrogenici . . . . .	22
1.3.2.5	Dinamica del calcio intracellulare $[Ca^{2+}]_i$ . . . . .	22
1.3.2.6	Cenni su Membrane Clock e Calcium Clock . . . . .	23
<b>2</b>	<b>Il nodo senoatriale umano</b>	<b>25</b>
2.1	Morfologia . . . . .	25
2.1.1	Posizione e struttura . . . . .	25
2.1.2	Cellule Paranodali . . . . .	27
2.2	Espressione genica . . . . .	28
2.2.1	Chandler et al. 2009 . . . . .	29
2.2.2	Danielsson et al. 2013 . . . . .	35
2.3	Elettrofisiologia . . . . .	36
2.3.1	Drouin 1997 . . . . .	37
2.3.2	Verkerk et al. 2007 a . . . . .	39
2.3.3	Verkerk et al. 2007 b . . . . .	42
2.3.4	Verkerk et al. 2009 a . . . . .	44
2.3.5	Verkerk et al. 2009 b e Verkerk e Wilders 2010 . . . . .	46
2.3.6	Verkerk et al. 2013 . . . . .	48
2.3.7	Danielsson et al. 2013 . . . . .	51
<b>3</b>	<b>Mutazioni geniche dei canali ionici</b>	<b>55</b>
3.1	Mutazione genica . . . . .	56
3.2	Linee cellulari . . . . .	59
3.2.1	Esempi di linee cellulari . . . . .	61
3.2.1.1	HEK 293 . . . . .	62
3.2.1.2	COS-7 . . . . .	63
3.2.1.3	Ovociti di Xenopus . . . . .	63
3.2.1.4	tsA201 . . . . .	63

---

3.2.1.5	MEF . . . . .	64
3.2.2	Trasfezione genica . . . . .	64
3.2.3	Espressione eterologa di canali ionici e mutagenesi . . . . .	67
3.3	Principali mutazioni legate ad aritmie cardiache . . . . .	69
3.3.1	Mutazioni del canale funny . . . . .	70
3.3.1.1	G480R . . . . .	72
3.3.1.2	A485V . . . . .	73
3.3.1.3	K530N . . . . .	74
3.3.1.4	S672R . . . . .	74
3.3.1.5	573X . . . . .	75
3.3.1.6	695X . . . . .	76
3.3.1.7	D553N . . . . .	76
3.3.1.8	M54T . . . . .	77
3.3.1.9	Discussione . . . . .	78
3.3.2	Mutazioni del canale del sodio . . . . .	81
3.3.2.1	$\Delta$ KPQ, insD1795-1796, $\Delta$ K1500, D1790G, E1784K . . . . .	83
3.3.2.2	E161K . . . . .	84
3.3.2.3	D1275N . . . . .	84
3.3.2.4	G1408R, R1623X, T187I, K1578fs/52 e W1421X . . . . .	85
3.3.2.5	T220I, P1298L, delF1617, R1632H . . . . .	85
3.3.2.6	D1595H . . . . .	86
3.3.2.7	L212P . . . . .	86
3.3.2.8	Discussione . . . . .	87
3.3.3	Mutazioni dei canali del potassio . . . . .	92
3.3.3.1	T613M e G628S . . . . .	94
3.3.3.2	M54T . . . . .	95
3.3.3.3	S140G, $\Delta$ F339 e V241F . . . . .	95

3.3.3.4	G325R, V141M e R231C . . . . .	95
3.3.3.5	Discussione . . . . .	96
3.3.4	Mutazioni del canale del calcio . . . . .	99
3.3.4.1	G402S e G406R . . . . .	100
3.3.4.2	insG403-404 . . . . .	101
3.3.4.3	Discussione . . . . .	101
3.4	Considerazioni finali . . . . .	103
<b>4</b>	<b>Analisi modellistica</b>	<b>105</b>
4.1	Modelli atriali umani non specializzati . . . . .	105
4.1.1	Koivumäki et al. 2011 . . . . .	106
4.1.2	Grandi et al. 2011 . . . . .	109
4.1.3	Confronto . . . . .	112
4.2	Sviluppo del modello SAN umano . . . . .	114
4.2.1	Modello di partenza . . . . .	115
4.2.1.1	Corrente funny ( $I_f$ ) . . . . .	117
4.2.1.2	Corrente di calcio L-type ( $I_{CaL}$ ) . . . . .	117
4.2.1.3	Corrente di calcio T-type ( $I_{CaT}$ ) . . . . .	117
4.2.1.4	Correnti rettificatrici di potassio ( $I_{Kr}$ , $I_{Ks}$ ) . . . . .	118
4.2.1.5	Altre correnti ( $I_{Na}$ , $I_{to}$ , $I_{K,ACh}$ ) . . . . .	118
4.2.1.6	Pompe e scambiatori ( $I_{NaK}$ , $I_{NaCa}$ ) . . . . .	118
4.2.1.7	Discussione . . . . .	119
4.2.2	Modifiche apportate . . . . .	121
4.2.2.1	Corrente $I_f$ . . . . .	121
4.2.2.2	Corrente $I_{Kr}$ . . . . .	123
4.2.2.3	Corrente $I_{Ks}$ . . . . .	124
4.2.2.4	Corrente $I_{Kur}$ . . . . .	125
4.2.2.5	Transiente di $[Ca^{2+}]_i$ . . . . .	127

4.2.2.6	Aggiustamenti minori . . . . .	128
4.2.3	Risultato . . . . .	129
4.2.4	Validazione . . . . .	132
4.2.5	Discussione . . . . .	139
<b>5</b>	<b>Mutazione T78M della caveolina-3</b>	<b>143</b>
5.1	Caveole e caveolina . . . . .	143
5.2	Descrizione della mutazione T78M . . . . .	147
5.2.1	Fenotipo . . . . .	148
5.2.2	Cause . . . . .	148
5.2.3	Effetti sulle correnti ioniche . . . . .	149
5.2.3.1	Effetto su $I_f$ . . . . .	149
5.2.3.2	Effetto su $I_{K_{kur}}$ . . . . .	151
5.2.3.3	Effetto su $I_{Na}$ . . . . .	152
5.2.3.4	Effetto su $I_{K1}$ . . . . .	153
5.3	Modello matematico della mutazione . . . . .	155
5.3.1	Corrente $I_f$ . . . . .	155
5.3.2	Corrente $I_{K_{kur}}$ . . . . .	155
5.3.3	Corrente $I_{Na}$ . . . . .	156
5.3.4	Corrente $I_{K1}$ . . . . .	157
5.4	Simulazione modellistica . . . . .	159
5.4.1	Modello Koivumäki . . . . .	159
5.4.2	Modello Grandi . . . . .	161
5.4.3	Modello SAN umano . . . . .	164
5.5	Discussione . . . . .	166
	<b>Conclusioni</b>	<b>175</b>
<b>A</b>	<b>Software impiegati</b>	<b>179</b>

<b>Bibliografia</b>	<b>183</b>
<b>Elenco delle figure</b>	<b>207</b>
<b>Elenco delle tabelle</b>	<b>217</b>
<b>Glossario</b>	<b>223</b>

# Introduzione

Per le civiltà antiche, il cuore era considerato molto più di una semplice pompa: era la sede dell'anima. Quando gli antichi Egizi mummificavano i loro morti, rimuovevano la maggior parte dei visceri, ma lasciavano nella propria sede il cuore in modo che potesse essere pesato dagli dei, come un indicatore del comportamento etico del defunto. Aristotele considerava il cuore l'organo più importante dell'organismo e anche la sede dell'intelligenza. Segni di queste antiche credenze sono presenti in frasi ed espressioni che usiamo ancora oggi, per esempio "essere senza cuore". Il legame tra il cuore e la mente è, ancora oggi, oggetto di studio [111].

Più di 100 anni fa, nel 1907, esaminando istologicamente cuori umani con l'intenzione iniziale di definire i meccanismi dietro la chiusura delle grandi vene durante la sistole atriale, Sir Arthur Keith scoprì il nodo senoatriale [59]. Durante questi studi egli definì *“a small condensed area of tissue, just where the cava sank into the auricle”*, ma non le fu attribuita un'importanza funzionale. In seguito alla scoperta e alla descrizione, da parte di Sunao Tawara, del fascio di His, gli studi di Keith ricevettero un nuovo impulso e, insieme allo studente di medicina Martin Flack, egli fu ispirato a proseguire le proprie ricerche sul cuore dei piccoli mammiferi, tra cui le talpe. Proprio qui, scoprirono *“a wonderful structure in the right auricle”*, che era identicamente riprodotta in tutti i cuori successivamente studiati.

Fu non prima dei quattro anni seguenti che questa si scoprì essere la sede di origine della stimolazione elettrica naturale cardiaca [82].

Con il termine elettrofisiologia si indica la disciplina scientifica, branca della fisiologia, relativa allo studio del funzionamento di cellule e tessuti biologici dell'organismo dal punto di vista dei fenomeni elettrici che si verificano sia in condizioni fisiologiche normali, sia in risposta a sollecitazioni esterne. Per via delle sue caratteristiche, la branca dell'elettrofisiologia si presta molto bene ad essere interpretata attraverso strumenti di tipo matematico. L'idea della presenza di fenomeni elettrici nel corpo umano è nata e cresciuta nell'arco di alcuni secoli, ma non è un caso che le scoperte più importanti siano frutto dell'impiego dei risultati sperimentali biologici per lo sviluppo di rappresentazioni astratte sotto forma di modelli.

In ambito cardiaco, l'utilizzo di modelli matematici ha giocato un ruolo importante nel guidare il progresso della ricerca in questo campo. I primi modelli dell'attività elettrica del cuore furono sviluppati già dagli anni '60 e originano dal lavoro pionieristico di Hodgkin e Huxley, che, nel 1952, formularono una descrizione matematica dell'assone gigante di calamaro [49]. Da allora il progresso tecnologico degli strumenti di indagine ha fornito un livello di dettaglio sempre crescente nella comprensione dell'attività biologica a livello subcellulare e molecolare ed ha permesso di aumentare in maniera esponenziale la complessità delle rappresentazioni matematiche.

L'utilizzo dei modelli, ampiamente diffuso non solo in elettrofisiologia, è alla base di discipline come l'ingegneria e molte altre branche della scienza. Normalmente esso porta a risultati che sono subordinati alla conoscenza dell'entità rappresentata ed alle scelte del modellista riguardo ai formalismi adottati: quando i risultati della correlazione tra dati sperimentali e modello sono apprezzabili, ci si può aspettare di essere giunti ad una descrizione accurata del fenomeno o, addirittura, di aver

acquisito una (seppur spesso incompleta) capacità predittiva. In caso negativo, è necessario non soltanto chiedersi se sia sbagliata l'ipotesi di partenza, ma anche se l'entità osservata sia descritta correttamente: il grande vantaggio è rappresentato dalla possibilità di formulare nuove ipotesi seguendo un approccio più metodologico e coerentemente con la natura e i meccanismi del fenomeno studiato. In questo senso i modelli cardiaci svolgono una varietà di ruoli importanti, tra cui la descrizione dei complessi rapporti tra le risposte biologiche, l'interpretazione di dati sperimentali, lo svolgimento di test per la verifica dell'idoneità di progetti sperimentali, l'individuazione di obiettivi per una ricerca più dettagliata, il monitoraggio della risposta del sistema e dei suoi componenti ad un intervento definito e, soprattutto, date le difficoltà nell'allestimento di esperimenti in vitro soddisfacenti e nella reperibilità di cellule umane, l'analisi dell'effetto di trattamenti farmacologici sul normale funzionamento del cuore e la formulazione di ipotesi e previsioni di comportamento biologico di interesse clinico, in quanto strettamente correlato allo sviluppo futuro di cure per varie forme di patologie cardiache.



# Obiettivi

Le cellule pacemaker che formano il nodo senoatriale del cuore sono, in condizioni fisiologiche, le dirette responsabili dello stimolo elettro-chimico alla base del meccanismo di eccitazione e contrazione del cuore: le loro caratteristiche le rendono auto-oscillanti, ovvero in grado di generare un potenziale d'azione ritmico senza necessità di stimoli esterni, detto, appunto, pacemaker [82]. L'estensivo lavoro svolto sui piccoli mammiferi (ad esempio topo e coniglio) ha fornito, nel corso degli anni, importanti informazioni sui meccanismi ionici responsabili della generazione dell'attività pacemaker spontanea del nodo senoatriale e della forma unica del potenziale d'azione di queste cellule. Nonostante tali grandi progressi, i meccanismi alla base del pacemaking negli esseri umani non sono, tuttora, completamente compresi [32].

In un simile contesto, il *primo obiettivo* di questo lavoro di tesi è quello di sviluppare il primo modello matematico di potenziale d'azione pacemaker umano: è vero che gli studi elettrofisiologici pubblicati sull'uomo non hanno ancora raggiunto la mole di risultati ottenuti, invece, sugli altri mammiferi da laboratorio, ma i tempi possono ritenersi "maturi", in quanto i dati disponibili in letteratura sono sufficienti e adeguati allo scopo.

I modelli computazionali sono identificati come strumenti di grandissima utilità: essi trovano largo impiego nell'interpretazione dei dati sperimentali e nella comprensione delle basi elettrofisiologiche e dei processi ionici e molecolari all'origi-

ne degli stati patologici, in particolare nei casi di malattie genetiche aritmogene, il cui studio sta divenendo quanto mai centrale in campo clinico. A tal proposito, il *secondo obiettivo* di questo lavoro di tesi nasce direttamente dall'esigenza clinica di definire le relazioni causa-effetto tra la mutazione T78M della proteina caveolina-3 e le varie forme di aritmie cardiache riscontrate, ad essa associate. Lo scopo è quello di stabilire quale sia il link tra genotipo della mutazione e fenotipo risultante, ovvero colmare il gap esistente tra i dati sperimentali in vitro in possesso ed i meccanismi di alterazione delle correnti ioniche affette, per arrivare a osservare l'effetto che ne deriva sull'attività elettrica delle cellule. Proprio in relazione a quest'ultimo punto, i due obiettivi del lavoro convergono: l'analisi degli effetti indotti dalla mutazione T78M è, infatti, effettuata sul modello di potenziale d'azione di nodo senoatriale umano sviluppato (oltre che su altri modelli atriali).

L'elaborato di tesi riepiloga le caratteristiche peculiari del tessuto cardiaco atriale, distinguendo le proprietà morfologiche ed elettrofisiologiche delle cellule specializzate (pacemaker) e non specializzate (miociti di lavoro), con particolare attenzione rivolta alle rispettive forme del potenziale d'azione (Capitolo 1). In seguito, raccoglie, nel Capitolo 2, tutta la "conoscenza" scientifica, disponibile ad oggi in letteratura, relativamente al nodo senoatriale umano. Il Capitolo 3 affronta l'argomento delle mutazioni geniche, dalla loro definizione, passando per i metodi di studio impiegati nella loro caratterizzazione elettrofisiologica in laboratorio, fino ad arrivare a descrivere le mutazioni che colpiscono i principali canali ionici cardiaci in associazione a patologie aritmogene. Infine, l'elaborato si concentra sulla parte sperimentale del lavoro: presentazione dei modelli di potenziale d'azione atriale umano più recenti e illustrazione dello sviluppo del primo modello matematico di potenziale d'azione di nodo senoatriale umano (Capitolo 4); caratterizzazione della mutazione T78M della caveolina-3 in base ai dati forniti da Andrea Barbuti (provenienti dal laboratorio del Dipartimento di Bioscienze del-

l'Università degli Studi di Milano) e a quelli presenti in letteratura, creazione del modello matematico della mutazione e suo impiego per la simulazione nei modelli di potenziale d'azione umano pacemaker sviluppato e atriali (Capitolo 5).



# Capitolo 1

## Il tessuto atriale

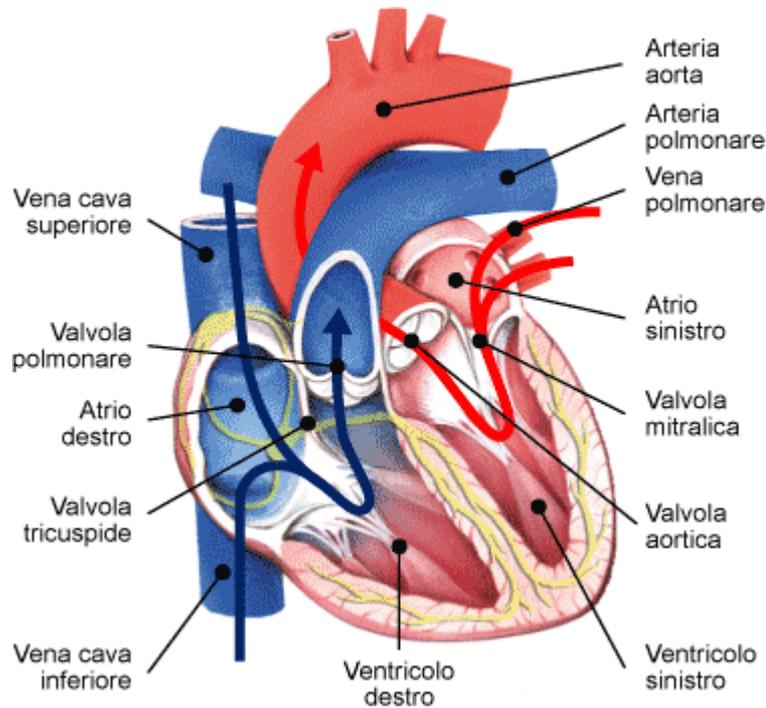
### Introduzione

In questo primo capitolo verrà fatta una breve panoramica sull'organo cuore, per poi analizzare il tessuto cellulare che lo compone, con particolare riferimento a quello atriale che, a sua volta, verrà differenziato, più in dettaglio, in tessuto di lavoro e di conduzione. Seguirà una descrizione sintetica dei meccanismi alla base dell'attività elettrica in questi tessuti, che darà infine spazio alla presentazione del potenziale d'azione cardiaco nelle sue forme caratteristiche in ciascuno dei tessuti analizzati.

### 1.1 Il cuore

Il cuore è un organo cavo di forma conica, posto nella cavità toracica, più precisamente nel mediastino medio, dietro lo sterno e le cartilagini costali, che lo proteggono come uno scudo, davanti alla colonna vertebrale, da cui è separato dall'esofago e dall'aorta, appoggiato sul diaframma, che lo separa dai visceri sottostanti. Esso è avvolto da un robusto sacco membranoso, il pericardio, con-

tenente un liquido, il liquido pericardico, ad azione lubrificante contro la frizione esercitata sulle pareti del cuore mentre questo è intento a battere.



**Figura 1.1:** Raffigurazione del cuore in sezione frontale.

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato circolatorio: funge da pompa capace di produrre una pressione sufficiente a permettere la circolazione del sangue. È costituito da due pompe intermittenti, dette cuore destro e sinistro, che alimentano rispettivamente la circolazione polmonare e sistemica. La parte destra riceve il sangue di ritorno proveniente dai tessuti periferici e lo invia ai polmoni per essere ossigenato; la parte sinistra riceve il sangue appena ossigenato a livello dei polmoni e lo pompa verso i tessuti dell'organismo [111]. Ogni metà del cuore è formata da un atrio (*atrium*, vestibolo) superiormente e da un ventricolo (*ventriculum*, piccolo ventre) inferiormente. Struttura e dimensione di atri e ventricoli sono correlate alle loro rispettive funzioni: la minor pressione che gli atri devono sviluppare per garantire il flusso sanguigno ai ventricoli, rispetto alla pressione ventricolare

necessaria all'alimentazione dei circoli polmonare e sistemico, ne giustifica infatti il più ridotto volume e spessore di parete. Inoltre lo sbilanciamento volumetrico tra ventricolo destro e sinistro è coerente con il maggior carico associato al grande circolo.

Gli orifizi attraverso i quali si ha l'ingresso e l'uscita di sangue dai ventricoli, sono delimitati da quattro anelli di tessuto connettivo fibroso su cui si inseriscono i lembi delle sottili membrane collaginee flessibili che costituiscono le valvole cardiache al livello del piano valvolare [111]. Le valvole mitrale e tricuspide mettono in comunicazione atri e ventricoli, mentre le valvole aortica e polmonare sono i punti d'uscita verso l'aorta e l'arteria polmonare.

## 1.2 Tessuto specializzato e non specializzato

L'azione meccanica del cuore, inteso come pompa idraulica, è resa possibile in seguito ad eventi elettrici che coinvolgono le singole cellule che lo compongono, una proprietà che classifica il tessuto cardiaco tra i tessuti eccitabili insieme al muscolo scheletrico e alle cellule nervose. A livello cellulare, l'evento elettrico è il segnale che innesca la contrazione meccanica, inducendo un aumento transitorio del calcio intracellulare che, a sua volta, trasporta il messaggio di contrazione alle proteine contrattili della cellula. Per questi motivi, il processo che abbina l'eccitazione elettrica alla funzione meccanica è chiamato *accoppiamento eccitazione-contrazione*.

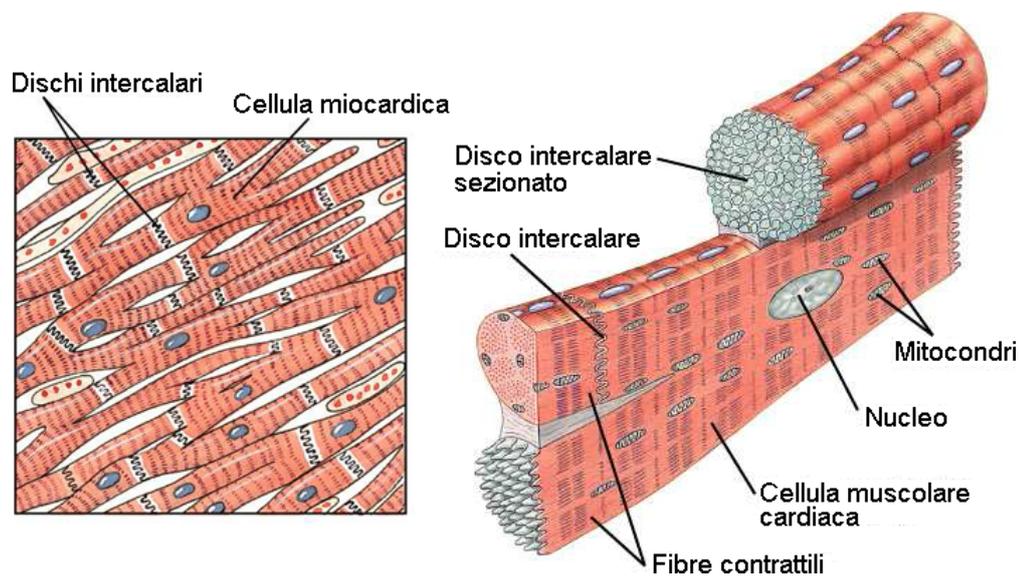
Gran parte della massa del cuore è costituita dalle cellule muscolari o miocardio. Queste possono essere suddivise, in base alla propria funzione e alle proprie caratteristiche fisiologiche, in miociti di lavoro, contrattili, che compongono la maggior parte del miocardio e sono detti non specializzati; e miociti di conduzione, che constano circa nell'1% delle cellule miocardiche e sono definiti specializzati,

in quanto sono responsabili del segnale miogeno della contrazione (cioè che origina all'interno del miocardio stesso), proprietà caratteristica del cuore che può così contrarsi in assenza di uno stimolo esterno [111]. La precisa sede di origine di tale segnale, è collocata a livello degli atri e, più precisamente, nell'atrio destro. Da qui in avanti l'attenzione verrà posta sul tessuto atriale, distinguendolo in *tessuto atriale specializzato* e *non specializzato* (le proprietà anatomiche di quest'ultimo sono valide anche nel caso delle cellule miocardiche ventricolari).

### 1.2.1 Miociti atriali di lavoro

Le cellule muscolari atriali non specializzate vengono classificate come striate, poiché l'osservazione al microscopio ottico di preparati tissutali, rivela la presenza di miofibrille con le tipiche striature trasversali (figura 1.2), ordinate in bande più chiare e più scure, e presentano strutture microscopiche comparabili alle cellule scheletriche. Come queste infatti, sono strutturate in sarcomeri, estesi da linea Z a linea Z, in cui si denota una rete citoscheletrica organizzata in filamenti proteici spessi di miosina, i quali si intercalano con quelli sottili di actina ai fini della contrazione. Tuttavia, vi sono differenze sostanziali tra il tessuto muscolare striato miocardico e quello scheletrico. Le cellule muscolari atriali sono molto più piccole delle cellule muscolari scheletriche e sono mononucleate (possiedono un singolo nucleo) [111]. Esse non sono elementi sinciziali, ma si ramificano e si collegano alle cellule adiacenti tramite le loro estremità terminali per formare una rete complessa (figura 1.2) che realizza un sincizio funzionale soprattutto dal punto di vista della contrazione, la quale avviene in maniera sincrona in tutto il miocardio. Infatti, le connessioni intercellulari, note come dischi intercalari (figura 1.2), sono costituite dalle membrane cellulari interdigitate: i tratti perpendicolari del disco intercalare sono zonule aderenti, quindi giunzioni aderenti di tipo meccanico che servono a vincolare tra loro i cardiomiociti contigui; accanto

a queste, vi sono i desmosomi, che hanno il compito di trasferire la tensione generata al momento della sistole in una cellula alle cellule adiacenti, ripartendola in modo equilibrato; i tratti longitudinali del disco intercalare presentano invece le giunzioni comunicanti (gap junction), le quali non hanno funzione meccanica, ma elettrica e consentono la rapida propagazione dell'impulso tra i cardiomiociti in modo che la contrazione delle cellule avvenga quasi simultaneamente e gli atri si contraggano come in un unico spasmo coordinato [111].



**Figura 1.2:** Figura adattata da Silverthorn et al. [111]: raffigurazione di cardiomiocita.

Un'altra differenza con il muscolo scheletrico riguarda il sistema di accoppiamento elettromeccanico: nei cardiomiociti atriali si trova un solo tubulo T per ogni sarcomero in corrispondenza della linea Z. I tubuli T, inoltre, sono di calibro maggiore e si ramificano all'interno della cellula miocardica. Il reticolo sarcoplasmatico forma delle cisterne ai lati del tubulo T ed è meno esteso rispetto a quello delle cellule muscolari scheletriche [111].

Dal punto di vista ultrastrutturale, circa un terzo del volume di una cellula cardiaca contrattile è occupato da mitocondri, a dimostrazione della forte richiesta di

energia. Inoltre si possono notare quantità elevate di mioglobina e basse di granuli di glicogeno (come è tipico nelle fibre muscolari rosse).

I cardiomiociti sono leggermente diversi a seconda del distretto cardiaco cui appartengono. Negli atri, dove il miocardio è più sottile e la contrazione per la propulsione del sangue più modesta, i cardiomiociti sono più piccoli, tipicamente con lunghezza di 50-150  $\mu\text{m}$  e raggio di 10-20  $\mu\text{m}$ . In particolari zone dell'atrio, come le auricole, essi hanno caratteristiche endocrine: secernono un ormone chiamato peptide natriuretico atriale (ANP), che serve a regolare la pressione del sangue. Di conseguenza, in questi cardiomiociti saranno presenti dei granuli di secrezione elettrondensi.

### 1.2.2 Miociti atriali nodali

Il segnale elettrico per la contrazione del miocardio è stato, in precedenza, definito miogeno: esso non proviene dal sistema nervoso, ma da cellule miocardiche specializzate dette cellule autoritmiche, anche definite pacemaker (segnapassi) perché controllano la frequenza del battito cardiaco. Il tessuto specializzato è una rete di cardiomiociti adibiti non soltanto alla genesi dell'impulso eccitatorio, ma anche alla sua conduzione. Dalla disfunzione di questo tessuto originano molte patologie cardiache [101].

Il sistema di conduzione atriale include il nodo senoatriale (SAN, *Sinoatrial Node*), in grado di generare spontaneamente un segnale elettrico periodico ad una frequenza di 60-100 bpm; le vie intra-nodali, che appositamente conducono l'impulso al nodo atrioventricolare (AVN, *Atrioventricular Node*), mentre, parallelamente, l'eccitazione diffonde e si propaga radialmente attraverso le fibre miocardiche atriali. Il nodo AV è anch'esso dotato di automaticità e rappresenta l'unica struttura di connessione elettrica tra atri e ventricoli, isolati elettro-fisiologicamente da un insieme di robuste formazioni connettivali (fibre di collagene e in minor

parte fibre elastiche), disposte sul piano atrioventricolare, ovvero valvolare. Dal momento che la frequenza intrinseca del SAN è normalmente più alta e sopprime il pacemaking del AVN (pacemaker latente), esso è pertanto identificato come il naturale pacemaker cardiaco (l'automaticità del nodo AV può diventare predominante nel caso di disfunzione o blocco del SAN).

Le cellule del tessuto atriale nodale sono anatomicamente distinte dalle cellule contrattili. Una caratteristica delle cellule nodali senoatriali, al microscopio ottico, è l'alta densità di nuclei: tale caratteristica riflette il fatto che le cellule SAN siano molto piccole rispetto a quelle atriali circostanti: nell'uomo è riportato che le cellule centrali del nodo abbiano un diametro di circa 5-10  $\mu\text{m}$  [54]. Oltre alle minori dimensioni, le cellule atriali specializzate sono quasi prive di componenti contrattili: il motivo risiede nel fatto che contengono soltanto pochi miofilamenti e mal organizzati (disposti in tutte le direzioni e non organizzati in miofibrille). Nell'essere umano le cellule tipiche nodali contengono, inoltre, un numero minore di mitocondri e distribuiti in modo casuale, e un ridotto reticolo sarcoplasmatico [54]. L'assenza di miofilamenti e mitocondri può essere compresa, in un tessuto specializzato come quello nodale, per la propria funzione elettrica piuttosto che meccanica: le cellule autoritmiche non contribuiscono alla forza contrattile del cuore.

Nell'uomo vi è evidenza di una graduale transizione nella morfologia cellulare [54], dal centro del nodo senoatriale, in tutte le direzioni verso la periferia, dove il SAN incontra il muscolo atriale: non vi è un confine netto tra il nodo e il muscolo atriale. Dal centro alla periferia, infatti, la forma e la disposizione delle cellule diventano più regolari e i miofilamenti più numerosi e meglio organizzati [20].

Infine la velocità di conduzione nel nodo del seno è molto lenta rispetto al tessuto atriale non specializzato. Questo è il risultato di un accoppiamento elettrico povero, derivante dalla relativa scarsità delle gap junctions nel centro del nodo rispetto

alla periferia [20].

### 1.3 Il potenziale d'azione atriale

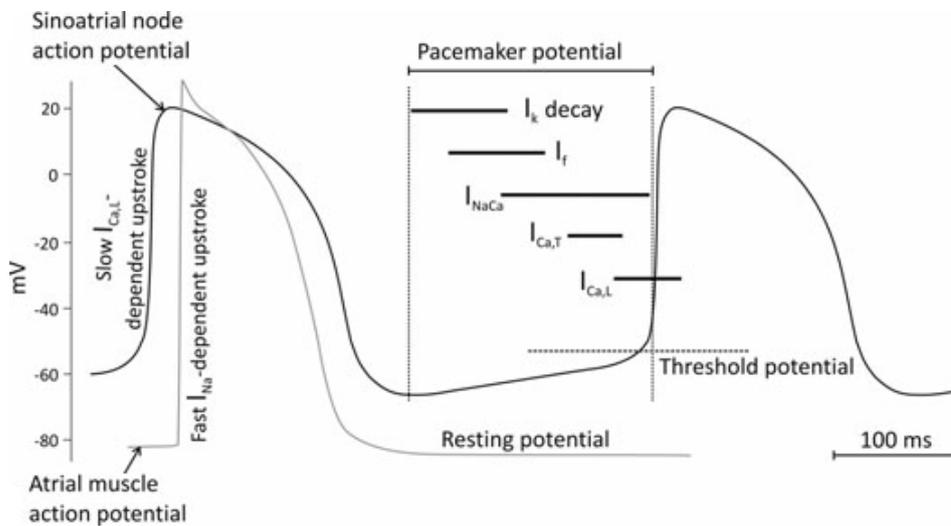
Nei paragrafi precedenti si è fatto riferimento genericamente alla generazione e diffusione attraverso le cellule miocardiche di un segnale di tipo elettrico. Tale segnale è noto come il potenziale d'azione cardiaco e la sua origine risiede nei meccanismi biochimici cellulari. Per meglio comprenderli, si riassumono, di seguito, concetti di base sul potenziale di membrana e il potenziale d'azione.

Il potenziale di membrana di una cellula è la differenza di potenziale che si misura ai capi della membrana cellulare, risultante da un processo di natura elettrochimica di diffusione degli ioni (le specie ioniche principali presenti sono  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ ) attraverso la membrana stessa (generando correnti elettro-ioniche), mediato da proteine specializzate che costituiscono i canali ionici, gli scambiatori e i meccanismi attivi come le pompe elettrogeniche. I canali ionici sono sensibili a diversi fattori fisici e chimici che ne regolano lo stato di apertura (e, di conseguenza, il flusso/corrente di ioni che li attraversa), come ad esempio un determinato valore del potenziale transmembrana o il raggiungimento, su uno dei due lati del canale, di determinate concentrazioni ioniche. Al contrario dei canali ionici che permettono il flusso degli ioni in favore del loro gradiente di concentrazione e di potenziale elettrico (gradiente elettro-chimico), le pompe ioniche attive lavorano contro gradiente a spese di un consumo energetico di ATP. Gli scambiatori, invece, sfruttano l'energia potenziale originata dal trasferimento di uno ione secondo gradiente per mobilitarne un secondo contro gradiente. Il valore del potenziale di membrana, dunque, è determinato principalmente dalla differenza di concentrazione delle specie ioniche cariche tra l'interno e l'esterno della cellula, dalla permeabilità della membrana cellulare a tali ioni (conduttanza ionica) attraverso

i canali ionici e gli scambiatori, dall'attività dei meccanismi attivi che consentono di mantenere le concentrazioni ioniche ai lati della membrana. Nelle cellule cosiddette eccitabili, in seguito ad una stimolazione appropriata (che permette di superare la soglia di eccitabilità della cellula, stimolo "sopra soglia") l'attività dei canali di membrana può alterarsi, rompendo l'equilibrio elettro-chimico dei flussi ionici entranti e uscenti dalla cellula e così, partendo da condizioni di riposo (*potenziale di membrana a riposo*), il potenziale transmembrana può transitoriamente invertirsi diventando positivo (*depolarizzazione*) e generando un potenziale d'azione (AP, *Action Potential*), per poi tornare alla condizione di riposo (*ripolarizzazione*). Esistono diverse forme del potenziale d'azione a seconda del tipo di tessuto cellulare, ma, in qualunque forma esso sia, costituisce un segnale elettrico che può propagarsi con estrema velocità e che trasporta informazione per la comunicazione a livello intercellulare.

Il miocardio, come il muscolo scheletrico e i neuroni, è un tessuto eccitabile ed è in grado di generare potenziali d'azione. La differenza peculiare, rispetto ad una cellula muscolare scheletrica o ad un neurone, risiede nella durata del potenziale d'azione generato [111]: un tipico AP di un neurone o di una cellula muscolare scheletrica dura da 1 a 5 ms, mentre in una cellula miocardica esso è dell'ordine delle centinaia di millisecondi. Una maggiore durata del potenziale d'azione impedisce, nelle cellule del tessuto non specializzato, che si verifichi una contrazione mantenuta nel tempo, denominata tetano. Questa è una caratteristica fondamentale per la funzione del cuore che, tra una contrazione e la successiva, deve rilassarsi per permettere il riempimento delle camere [111].

La morfologia del potenziale d'azione cardiaco mostra una elevata variabilità all'interno del cuore, in particolare con l'AP di nodo senoatriale che differisce marcatamente dall'AP del cosiddetto miocardio di lavoro (*working myocardium*), in questo caso specifico, atriale (figura 1.3).



**Figura 1.3:** Figura tratta da Monfredi et al. [82]: tipici potenziali d'azione registrati da miociti atriali non specializzati (grigio) e da cellule nodali senoatriali (nero).

Di seguito verranno dettagliati questi due tipi di potenziale d'azione atriale dal punto di vista della morfologia e delle correnti ioniche in gioco, per capirne i meccanismi sottostanti e le proprietà che li differenziano. Alcuni dei parametri più utilizzati per descrivere la forma d'onda di un potenziale d'azione sono: la lunghezza del ciclo in ms (CL, *Cycle Length*); la durata dell'AP in ms calcolata ad una percentuale X della ripolarizzazione, solitamente 30, 50 o 90% (APD<sub>X</sub>, *Action Potential Duration at X% repolarization*); il massimo valore negativo del potenziale in mV, ovvero il potenziale di riposo nel caso delle cellule non specializzate (RMP, *Resting Membrane Potential*) e il massimo potenziale diastolico nel caso di quelle specializzate (MDP, *Maximum Diastolic Potential*); il massimo valore positivo del potenziale in mV (OS, *Overshoot*); l'ampiezza dell'AP in mV (APA, *Action Potential Amplitude*); la massima velocità di salita del potenziale d'azione durante la depolarizzazione in V/s ( $V_{max}$ , *maximum Velocity*); la pendenza della fase di depolarizzazione diastolica nel caso delle cellule specializzate in mV/s (DDR, *Diastolic Depolarization Rate*).

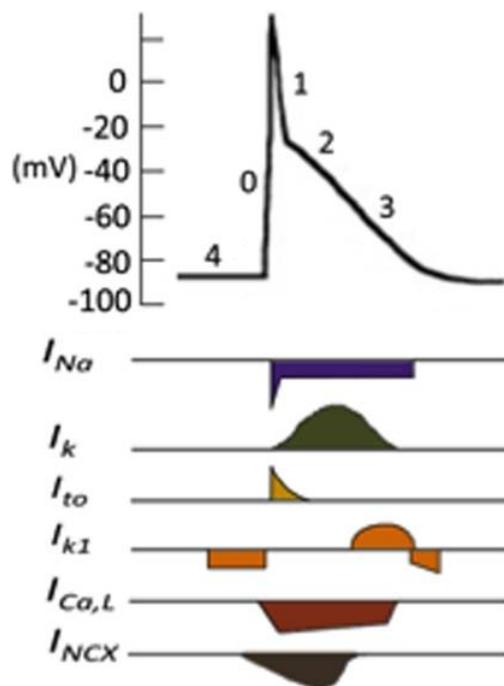
### 1.3.1 Potenziale d'azione delle cellule non specializzate

Il potenziale d'azione atriale umano non specializzato in genere mostra una morfologia triangolare (rispetto ad una forma *spike-and-dome*, con una prominente fase di plateau, della controparte ventricolare) come si può notare dalle figure 1.3 e 1.4. La durata dell'AP al 90% della ripolarizzazione, a 1 Hz, varia ampiamente tra 150 e 500 ms, forse influenzata dalle condizioni di registrazione e dalle concentrazioni ioniche [100]. Il potenziale di membrana a riposo è compreso tra -70 e -80 mV e risulta più depolarizzato rispetto a quello delle cellule ventricolari, mentre la massima velocità di salita cade nell'intervallo 150-300 V/s che è in contrasto con i valori più alti di 300-400 V/s misurati nelle cellule ventricolari [100]. Le differenze nella forma e nei parametri caratteristiche dei potenziali d'azione atriali e ventricolari umani sono replicate nella maggior parte dei mammiferi, ad eccezione del miocardio murino (ratto, topo), in cui le cellule sia atriali che ventricolari mostrano brevi potenziali triangolari [100].

La forma d'onda del potenziale d'azione atriale non specializzato è caratterizzata da cinque fasi distinte, ognuna delle quali connotata dal predominare di una più correnti ioniche (figura 1.4):

- *Fase 4* - il potenziale di membrana è al valore di riposo e tutti i canali sono in condizione di rispondere allo stimolo in arrivo;
- *Fase 0* - è chiamata depolarizzazione rapida: la cellula, dallo stato di riposo, subisce una brusca variazione di tensione verso potenziali positivi (*upstroke*). A circa +20/+40 mV si ha il picco massimo del potenziale, con un equilibrio puramente istantaneo tra correnti entranti e uscenti;
- *Fase 1* - è detta ripolarizzazione transiente, ovvero una prima ripolarizzazione della cellula, che ha un effetto poco pronunciato per il rapido sopraggiungere della fase successiva;

- *Fase 2* - è identificata come la fase di plateau, caratteristica delle cellule cardiache ventricolari in quanto determina la lunga durata del potenziale d'azione cardiaco, dovuta all'equilibrio delle correnti entranti ed uscenti e che impedisce, per un certo intervallo di tempo, che la cellula subisca altre depolarizzazioni. Nelle cellule contrattili atriali questa fase è meno pronunciata;
- *Fase 3* - è la fase di ripolarizzazione, in cui la cellula viene ripolarizzata fino a tornare al proprio valore di riposo.



**Figura 1.4:** Figura adattata da Park e Fishman [101]: morfologia, fasi e principali correnti sottostanti del potenziale d'azione di miocita atriale non specializzato.

Verranno ora descritte le correnti principali attive in ciascuna fase.

### 1.3.1.1 Correnti entranti depolarizzanti ( $\text{Na}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ )

Lo scatenarsi del potenziale d'azione atriale è dovuto alla rapida attivazione della corrente di sodio  $I_{\text{Na}}$  (figura 1.4), che è anche la principale determinante della massima velocità di upstroke dell'AP. Sono state riportate minime differenze funzionali nelle proprietà biofisiche di  $I_{\text{Na}}$  di ventricolo e atrio umani, ma recenti studi hanno dimostrato che i correlati molecolari di  $I_{\text{Na}}$  nel miocardio atriale e ventricolare sono diversi: anche se  $\text{Na}_v1.5$  risulta la principale subunità  $\alpha$  del canale del sodio, il trascritto per la subunità  $\beta$ ,  $\text{Na}_v\beta1$ , è maggiormente espresso nell'atrio [100]. Inoltre, a causa dell'RMP più depolarizzato,  $I_{\text{Na}}$  non recupera completamente dall'inattivazione e la disponibilità di corrente nei cardiomiociti atriali è inferiore, il che si traduce in una minore intensità della stessa [100].

La corrente di calcio di tipo L (*long lasting*, di lunga durata)  $I_{\text{CaL}}$  è, invece, principalmente responsabile della fase 2 del potenziale d'azione atriale (figura 1.4), durante la quale risulta entrante, così come del rilascio di calcio indotto dal calcio (CICR, *Calcium-induced Calcium Release*) nelle cellule<sup>1</sup>. Studi sperimentali hanno riportato differenze nella densità di corrente e nelle proprietà di inattivazione steady-state di  $I_{\text{CaL}}$  tra cellule atriali e ventricolari umane e, a livello di trascrizione, è stata riscontrata una maggiore espressione di subunità  $\alpha$   $\text{Ca}_v1.3$  e  $\text{Ca}_v3.1$  nell'atrio rispetto al ventricolo [100]. Inoltre, i potenziali più negativi ai quali avviene la fase 'di plateau' triangolare determinano una maggiore driving force di  $I_{\text{CaL}}$  ( $V_m - E_{\text{CaL}}$ , dove  $V_m$  rappresenta il potenziale di membrana e  $E_{\text{Ca}}$  il potenziale d'inversione<sup>2</sup>), fornendo una corrente di intensità maggiore rispetto al caso ventricolare [100].

Prove di patch-clamp hanno suggerito che la corrente di calcio di tipo T (*transient*, transiente)  $I_{\text{CaT}}$  non è presente nei miociti atriali umani non specializzati [100].

<sup>1</sup>Si veda il paragrafo sulla dinamica del calcio intracellulare per una descrizione dettagliata.

<sup>2</sup>In questo caso il potenziale di inversione non corrisponde al potenziale di Nernst, essendo il canale della corrente  $I_{\text{CaL}}$  permeabile in maniera non trascurabile anche agli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

### 1.3.1.2 Correnti uscenti ripolarizzanti ( $K^+$ )

La corrente chiave che determina il valore del potenziale di riposo è la corrente *inward rectifier*  $I_{K1}$ . Il nome deriva dalla sua proprietà di mostrare conduttanze diverse a seconda del valore del potenziale di membrana e, in particolare, risulta maggiormente attiva a potenziali estremamente negativi. Il termine "inward" può sembrare fuorviante, ma, conducendo ioni potassio, si tratta di una corrente uscente. Essa presenta una densità molto minore (circa 5-6 volte) nelle cellule atriali rispetto all'omologa ventricolare e questo spiega, in parte, la depolarizzazione del valori di RMP [100]. La minore densità di  $I_{K1}$  è anche responsabile, sempre in parte, della più lenta fase 3 di ripolarizzazione tardiva nell'atrio (figura 1.4). Infatti, il principale correlato molecolare di questa corrente, Kir2.1, è più robustamente espresso nel ventricolo umano [100].

I miociti atriali di lavoro esprimono la corrente di potassio transitoria uscente  $I_{to}$ <sup>3</sup>. Questa è responsabile della fase iniziale della ripolarizzazione del potenziale d'azione atriale (figura 1.4). È interessante notare che, pur avendo una conduttanza quasi 2 volte superiore nell'atrio rispetto al ventricolo, la densità di  $I_{to}$  sottostante i potenziali d'azione atriale e ventricolare è simile [100].

Le cellule atriali non specializzate esprimono, infine, tre correnti di potassio rettificatrici ritardate, che contribuiscono alla ripolarizzazione: le correnti ultra rapida  $I_{Kur}$ , rapida  $I_{Kr}$  e lenta  $I_{Ks}$ .  $I_{Kur}$  è presente solo nell'atrio (non nel ventricolo) ed è attiva durante le fasi 1 e 2 [100]. La sua natura di essere esclusiva del tessuto atriale l'ha resa un target interessante per lo sviluppo di farmaci antiaritmici e contro la fibrillazione atriale. Rispetto a  $I_{Kur}$ , il contributo di  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  al potenziale d'azione atriale di cellule non specializzate è minore, in parte a causa della minore densità e, in parte, a causa della forma triangolare e della fase 'di plateau' a potenziali

---

<sup>3</sup> $I_{to}$  è anche detta rapida, attivata dalla depolarizzazione, sensibile alla 4-aminopiridina, indipendente dal calcio.

relativamente negativi, che ne precludono la completa attivazione [100].

### 1.3.1.3 Altri canali ionici

Nei miociti non specializzati è stata riportata la presenza di una componente transiente uscente e calcio-dipendente della corrente  $I_{to}$  trasportata da ioni cloro, chiamata  $I_{to2}$  o  $I_{ClCa}$ . Essa è attiva durante la fase 1 di ripolarizzazione rapida [100]. È stata inoltre registrata la corrente *funny*  $I_f$ , attivata dall'iperpolarizzazione: il suo contributo al potenziale d'azione atriale non specializzato è piuttosto ridotto.

Oltre alle correnti discusse in precedenza, altri canali ionici sono attivati in condizioni specifiche e possono influenzare il potenziale d'azione atriale non specializzato. Questi includono la corrente di potassio attivata dall'acetilcolina  $I_{KACH}$  e quella sensibile all'ATP  $I_{KATP}$ . Alcuni report indicano la presenza di una corrente di potassio attivata dal calcio  $I_{KCa}$ , tuttavia la sua presenza e il suo contributo alla ripolarizzazione rimangono controversi. Infine, canali ionici attivati dallo stiramento ( $I_{SAC}$ ), scoperti in miociti atriali, influenzano sia l'RMP, sia l'APD, ma i loro correlati molecolari rimangono sconosciuti [100].

### 1.3.1.4 Pompe e scambiatori elettrogenici

Il potenziale d'azione sopra descritto si basa, per il suo funzionamento, su flussi di ioni tra interno ed esterno della cellula che tendono a modificare le concentrazioni (per la maggior parte all'interno della cellula, in quanto l'ambiente extracellulare risente molto meno delle variazioni e le concentrazioni ioniche possono essere assunte costanti). Intervengono quindi meccanismi di trasporto attraverso la membrana per riequilibrare la presenza di ioni. I due più importanti sono lo scambiatore sodio-calcio  $I_{NaCa}$  e la pompa sodio-potassio  $I_{NaK}$ .

Lo scambiatore  $Na^+-Ca^{2+}$  è il principale meccanismo di estrusione del calcio dalla

cellula. In condizioni di riposo, la membrana cellulare ha una scarsa permeabilità al calcio e non vi è sostanziale ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$ , mentre una notevole quantità entra durante il potenziale d'azione e deve essere successivamente rimossa onde evitarne un accumulo che porterebbe ad una disfunzione cellulare. Lo scambiatore estrude uno ione  $\text{Ca}^{2+}$  in cambio di tre ioni  $\text{Na}^+$ , generando così una corrente entrante che influenza la ripolarizzazione (figura 1.4). Occorre però sottolineare che l'attività dello scambiatore è fortemente influenzata dalle concentrazioni di calcio e sodio e l'intensità della corrente generata può, dunque, variare a seconda di queste: contribuisce alla ripolarizzazione nella fase iniziale del potenziale d'azione in risposta all'avvenuto ingresso di sodio ed è una corrente depolarizzante durante la successiva fase in cui estrude ioni calcio [100].

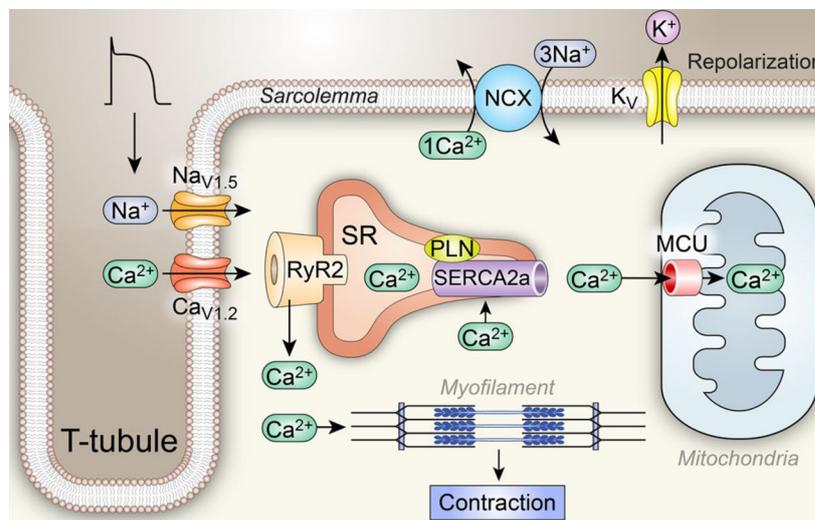
Ogni volta che un potenziale d'azione viene generato, in aggiunta alle rispettive concentrazioni fisiologiche nella cellula, ulteriori ioni sodio e potassio entrano ed escono dalla cellula stessa. Per mantenere l'omeostasi ionica ed i gradienti di concentrazione interviene la pompa  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasi}$ , che utilizza l'energia delle molecole di ATP per l'estrusione di tre ioni sodio in cambio di due ioni potassio. Si genera una corrente uscente che influenza sia il potenziale di membrana di riposo, sia la ripolarizzazione [100].

### 1.3.1.5 Dinamica del calcio intracellulare $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Il potenziale d'azione atriale umano è influenzato dalla concentrazione intracellulare di calcio: da essa dipende direttamente l'inattivazione di  $I_{\text{CaL}}$ , l'intensità e l'andamento temporale della corrente dello scambiatore  $I_{\text{NaCa}}$ , ed ha un'influenza indiretta sulla corrente della pompa  $I_{\text{NaK}}$  alterando, tramite lo scambiatore sodio-calcio, l'accumulo intracellulare di ioni  $\text{Na}^+$  [100].

Durante la fase 2 del potenziale d'azione atriale si ha l'attivazione dei canali ionici L-type del calcio, che assicurano l'entrata dello ione nella cellula. Oltre a rallenta-

re la ripolarizzazione in fase 2, ciò ha ulteriori conseguenze a livello intracellulare: l'aumento della concentrazione  $[Ca^{2+}]_i$  è il segnale chimico di attivazione per particolari recettori, definiti recettori per la rianodina (RyR, *Ryanodine Receptors*). Questi sono situati sulla superficie esterna del reticolo sarcoplasmatico, il cui scopo è l'accumulo di calcio. In risposta ad un leggero aumento nella concentrazione di calcio intracellulare e alla depolarizzazione stessa della zona di membrana cellulare che si affaccia sul reticolo, i RyR si attivano e permettono il rilascio di quantità di calcio molto maggiori, causando un meccanismo di amplificazione definito rilascio di calcio calcio-indotto o CICR (figura 1.5). Il calcio rilasciato va a legarsi ad una subunità di una proteina regolatrice, troponina, la quale normalmente inibisce il processo di scorrimento delle fibre muscolari di actina e miosina. Grazie al legame col calcio, l'inibizione si annulla e lo scorrimento delle fibre ha inizio.



**Figura 1.5:** Figura tratta da Luo et al. [72]: ciclo del calcio intracellulare.

Il reticolo sarcoplasmatico è solitamente collocato in un punto della cellula molto vicino alla membrana, con i recettori RyR orientati verso i canali L-type in modo da dare origine velocemente alla fase di amplificazione (figura 1.5): si viene a

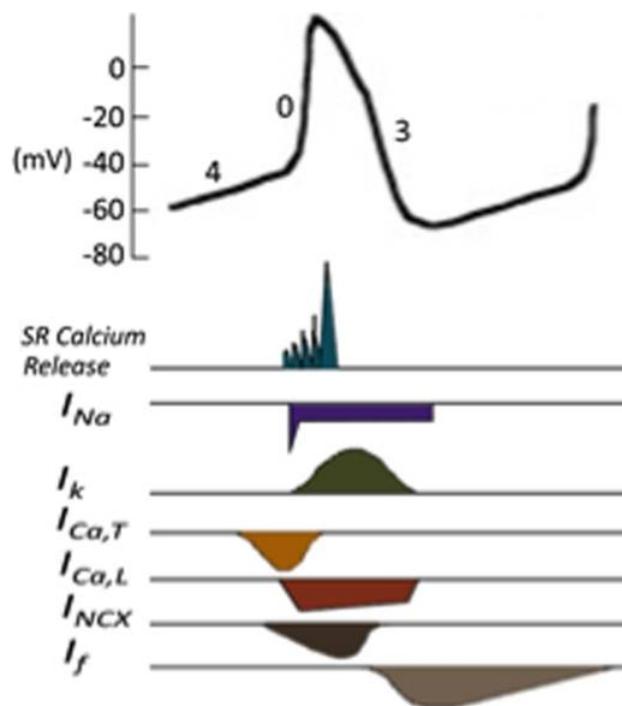
creare quindi una zona di stretto accoppiamento. Nel caso delle cellule contrattili cardiache, il calcio rilasciato dal reticolo e quello permeato attraverso il sarcolemma contribuiscono entrambi significativamente alla contrazione, mentre, nelle cellule muscolari scheletriche, il ruolo principale è affidato al calcio reticolare per via delle dimensioni molto maggiori di tali cellule. Infine, la grande quantità di calcio presente all'interno della cellula viene riassorbita per consentire il rilassamento del muscolo, sia attraverso la membrana cellulare (principalmente per mezzo dello scambiatore sodio-calcio e anche di una pompa specifica del calcio alimentata da ATP), sia tramite il reticolo, che ripristina le sue scorte per mezzo della pompa  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi (SERCA, *SarcoEndoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*).

### 1.3.2 Potenziale d'azione pacemaker

La morfologia tipica del potenziale d'azione pacemaker di cellula atriale specializzata è visibile nelle figure 1.3 e 1.6. Questo tipo di cardiomiocita, nell'uomo, in condizioni denervate, è capace di generare spontaneamente potenziali d'azione in maniera ciclica ogni 800-900 ms (nei mammiferi, il CL ha valori molto variabili in relazione alla taglia dell'animale stesso). Le proprietà autoritmiche di queste cellule derivano dal potenziale di membrana instabile, poiché esso non è mai "fisso" su un valore costante, ma, partendo da un MDP attorno a -60 mV (molto più depolarizzato rispetto al RMP dei miociti contrattili), lentamente sale verso il valore soglia per la scarica del potenziale d'azione [111]. La pendenza del potenziale di membrana in questa fase "instabile" è intorno a 30-60 mV/s, mentre la velocità di salita durante la depolarizzazione è molto inferiore a quella che si misura nelle cellule non specializzate e risulta minore di 10 V/s [20]. Infine, la durata del potenziale d'azione ( $\text{APD}_{90}$ ) varia nel range 100-200 ms.

Mantenendo la stessa nomenclatura vista per le cellule atriali di lavoro, il potenziale d'azione pacemaker è suddivisibile in tre fasi (figura 1.6):

- *Fase 4* - è la fase caratteristica di lenta e spontanea depolarizzazione ed è definita depolarizzazione diastolica (DD, *Diastolic Depolarization*). Può essere suddivisa in una prima fase (EDD, *Early Diastolic Depolarization*) e in una seconda subito precedente la sistole (LDD, *Late Diastolic Depolarization*). La DD conduce il potenziale di membrana fino alla soglia di eccitabilità;
- *Fase 0* - rappresenta la fase di depolarizzazione rapida. Raggiunto il potenziale di soglia attorno a -50/-40 mV, avviene l'upstroke che porta il potenziale fino al picco di circa +10/+20 mV;
- *Fase 3* - è la fase di ripolarizzazione, in cui il potenziale di membrana ritorna a valori negativi fino a raggiungere l'MDP.



**Figura 1.6:** Figura adattata da Park e Fishman [101]: morfologia, fasi e principali correnti sottostanti del potenziale d'azione di miocita atriale specializzato.

Verranno ora descritte le correnti principali attive in ciascuna fase.

### 1.3.2.1 Corrente *funny*

La corrente "funny" o *hyperpolarization-activated current*, è una corrente caratteristica del tessuto nodale e conduttivo: nonostante se ne rilevino deboli tracce anche nel miocardio contrattile, la maggiore densità di corrente (in condizioni fisiologiche) è caratteristica del nodo senoatriale e, in misura minore, del nodo atrioventricolare e nelle fibre del Purkinje. È stata battezzata come "funny" ( $I_f$ ) in quanto i canali ionici relativi a questa corrente presentano una permeabilità mista agli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  ed un'attivazione scatenata dalla ripolarizzazione/iperpolarizzazione che inizia attorno a  $-50$  mV [82]. Al termine della fase 3 del potenziale d'azione pacemaker, s'innesca l'attivazione di  $I_f$  che guida il potenziale durante l'intera fase 4 di depolarizzazione diastolica, con un contributo maggiore soprattutto nella fase EDD. Raggiunto il potenziale di soglia,  $I_f$  perde di intensità in seguito alla chiusura dei propri canali.

L'importanza della corrente funny nel pacemaking, oltre ad essere suggerita dall'abbondanza dei canali specifici (HCN1-4) espressi nel tessuto specializzato, è comprovata dalla propria responsività alla stimolazione da parte del sistema nervoso autonomo:  $I_f$  è influenzata dalle variazioni di cAMP<sup>4</sup>. Il grado di attivazione della corrente determina la frequenza del potenziale d'azione, agendo sulla pendenza della depolarizzazione diastolica in modo da raggiungere più o meno velocemente il potenziale di soglia. Se  $I_f$  viene bloccata (ad esempio con il cesio [82]), la frequenza cardiaca rallenta. Poiché i canali funny sono altamente specifici dei cardiomiociti nodali, rappresentano un potenziale target per i farmaci volti al controllo della frequenza cardiaca come l'ivabradina. Al contrario, la perfusione con adrenalina porta ad una accelerazione del ritmo cardiaco.

<sup>4</sup>Il cAMP (Adenosina mono fosfato ciclica) è un secondo messaggero nel pathway in risposta alla stimolazione dei recettori adrenergici (tramite adrenalina) e muscarinici (tramite acetilcolina).

### 1.3.2.2 Correnti entranti depolarizzanti ( $\text{Na}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ )

La corrente entrante di sodio  $I_{\text{Na}}$  ha un ruolo molto ridotto nel potenziale pacemaker: essa è infatti inespressa nel centro del nodo senoatriale, ma presente nella sua periferia [82]. Risulta attiva durante le fasi 4 e 0 del potenziale d'azione, ma, al contrario dei cardiomiociti contrattili in cui determina il rapido upstroke, nelle cellule SAN il contributo all'upstroke è praticamente insignificante. D'altro canto, recenti dati su mutazioni del canale  $\text{Na}_v1.5$  sottolineano l'importanza di  $I_{\text{Na}}$  nel pacemaking e nella conduzione<sup>5</sup>.

La corrente di calcio L-type è stata registrata nel nodo senoatriale, in cui, data l'assenza o la riduzione di intensità della corrente di sodio, il compito di scatenare la depolarizzazione sopra soglia della cellula è affidato a questa corrente. In base alle sue caratteristiche di attivazione e inattivazione meno veloci di quelle della corrente di sodio, l'upstroke avviene più lentamente, determinando la minore pendenza in fase 0 del potenziale d'azione pacemaker [82].

Infine, è stata rilevata la presenza anche dei canali di tipo T, responsabili della corrente  $I_{\text{CaT}}$ . Si aprono rapidamente già alla fine della fase 4 (LDD), ma si richiudono in fretta all'inizio della depolarizzazione e il loro contributo all'upstroke è ridotto [82].

### 1.3.2.3 Correnti uscenti ripolarizzanti ( $\text{K}^+$ )

Il ruolo delle correnti di potassio nel potenziale d'azione senoatriale è ampio e notevolmente differenziato. Per prima cosa è necessario indicare l'assenza della corrente rettificante  $I_{\text{K1}}$ , molto importante per la stabilizzazione del potenziale di riposo nelle cellule cardiache non specializzate [82].

Le correnti rettificanti  $I_{\text{Kr}}$  e  $I_{\text{Ks}}$  conservano, invece, un ruolo più importante. Ai potenziali positivi raggiunti dal potenziale d'azione pacemaker queste correnti si

---

<sup>5</sup>Si veda il capitolo 3.

attivano e permettono la ripolarizzazione della cellula. La componente  $I_{Ks}$  si attiva in ritardo e più lentamente rispetto alla componente rapida  $I_{Kr}$  e il suo contributo risulta di importanza relativamente variabile a seconda degli studi, anche a causa di dati sperimentali molto variabili.

La presenza nel tessuto nodale delle correnti transiente  $I_{to}$  ed ultra rapida  $I_{Kur}$  non è esclusa, ma il loro ruolo durante la fase di ripolarizzazione nella quale sono attive è modesto.

#### 1.3.2.4 Pompe e scambiatori elettrogenici

L'attività dei meccanismi di pompe e scambiatori è presente in misura più che significativa anche nelle cellule specializzate come quelle del nodo senoatriale. Lo scambiatore sodio-calcio intensifica la sua azione durante l'ultima fase della depolarizzazione diastolica (EDD), in risposta all'ingresso di calcio determinato inizialmente dalla corrente  $I_{CaT}$ <sup>6</sup>. Si genera una corrente netta entrante, amplificata dal successivo rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico. La corrente  $I_{NaCa}$  contribuisce alla salita del potenziale d'azione durante la fase 0.

La pompa sodio-potassio mantiene le sue caratteristiche, generando una corrente netta uscente che permette di riequilibrare le concentrazioni dei relativi ioni.

#### 1.3.2.5 Dinamica del calcio intracellulare $[Ca^{2+}]_i$

È da sottolineare che le cellule senoatriali, nonostante non svolgano funzione contrattile, possiedono comunque un reticolo sarcoplasmatico che riassorbe parte del calcio entrato nella cellula: l'aumento del calcio intracellulare e il successivo svuotamento del reticolo sarcoplasmatico costituiscono i segnali che intensificano l'attività dello scambiatore.

---

<sup>6</sup>Si veda il paragrafo sulle teorie di Membrane Clock e Calcium Clock per informazioni approfondite.

### 1.3.2.6 Cenni su Membrane Clock e Calcium Clock

Mentre la generazione del potenziale d'azione e l'interazione tra le varie correnti ioniche sono state studiate a fondo, tra i ricercatori è aperto un dibattito sull'"esatta" forza motrice alla base dell'automaticità delle cellule pacemaker. Due teorie sono state proposte per spiegare il meccanismo sottostante. Inizialmente, è stato descritto il meccanismo secondo il quale le oscillazioni ritmiche nel potenziale di membrana sono innescate principalmente dall'attività della corrente funny (ipotesi del *Membrane Clock*) [32]. Recentemente ha preso piede l'idea di un secondo meccanismo (*Calcium Clock*): secondo questa ipotesi, alla base dell'automaticità dell'AP vi è l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio causato da rilasci ritmici e spontanei di  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo sarcoplasmatico. Data la sensibilità dello scambiatore sodio-calcio alla concentrazione  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , questo genererebbe una considerevole corrente entrante responsabile del raggiungimento del potenziale di soglia per il potenziale d'azione [32].

Nei piccoli mammiferi vi sono prove attribuibili ad entrambi i meccanismi di pacemaking, ma le basi molecolari del pacemaking nel cuore umano sono molto meno conosciute [32]. Indipendentemente dall'importanza specifica dei meccanismi proposti, si tratta di due fenomeni strettamente accoppiati che si influenzano reciprocamente, il che rende più difficile determinare quale dei due sia predominante, ammesso che uno dei due lo sia. Va inoltre tenuto conto dell'esistenza di differenze regionali nell'espressione delle correnti ioniche che possono contribuire a intensificare o ridurre il contributo di  $I_f$  e  $I_{\text{NaCa}}$  cellula per cellula [56], portando a equilibri diversi tra le due.



# **Capitolo 2**

## **Il nodo senoatriale umano**

### **Introduzione**

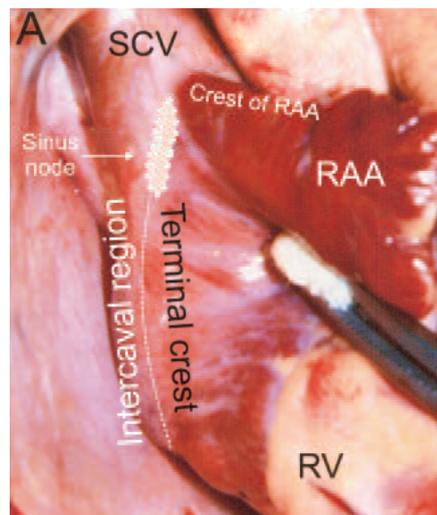
Nel capitolo precedente è stato presentato il potenziale d'azione tipico delle cellule pacemaker. Tutte le informazioni, oggi accertate e convalidate, sono state ricavate dopo decenni di scoperte e studi scientifici, esclusivamente da esperimenti su preparati e cellule di origine animale, quali topo e coniglio principalmente. In questo capitolo verrà, al contrario, discusso il nodo senoatriale umano, attraverso una revisione aggiornata delle informazioni presenti nella letteratura scientifica riguardanti morfologia, espressione genica ed elettrofisiologia, e attraverso una raccolta dei dati disponibili ad oggi.

### **2.1 Morfologia**

#### **2.1.1 Posizione e struttura**

Il nodo senoatriale è, normalmente, il pacemaker dominante nel cuore umano ed è stato originariamente descritto nel 1907 come struttura subepicardica,

alla giunzione tra l'atrio destro e la vena cava superiore [59]. Si trova in cima (superiormente), nell'atrio destro, all'incrocio della crista terminalis (uno spesso fascio di tessuto atriale al bordo dell'appendice atriale) con il tessuto venoso (vena cava superiore ed inferiore) e la regione intercavale tra le due grandi vene [20] (figura 2.1).



**Figura 2.1:** Figura tratta da Dobrzynski et al. [33]: vista ventrale dell'atrio destro umano che mostra la sede del nodo senoatriale (SCV, *Superior Caval Vein*; RAA, *Right Atrial Appendage*; RV, *Right Ventricle*).

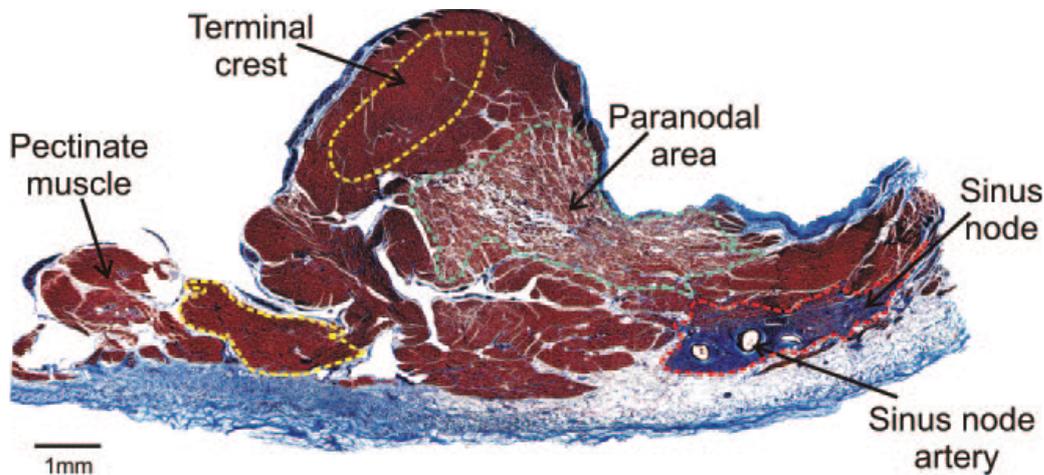
Le prime raffigurazioni del nodo senoatriale a partire dal 1960, mostravano che si trattava di una struttura relativamente limitata, ma ricostruzioni seguenti lo hanno caratterizzato come una più diffusa ed elaborata struttura, che si estende lungo la parte infero-laterale della crista terminalis in forma come di un "sigaro" o di mezzaluna [82]. Il SAN può, infatti, estendersi dalla vena cava superiore a quella inferiore, perché la posizione dell'apparente origine del potenziale d'azione, misurata con elettrodi extracellulari sulla superficie epicardica [19], è risultata molto variabile proprio all'interno del tratto compreso tra le due vene [20]. Studi istologici umani hanno dimostrato che il nodo del seno ha una lunghezza media di 13.5

mm e i suoi margini sono irregolari, con radiazioni multiple interdigitate con il miocardio atriale [113].

Una caratteristica peculiare è l'esteso tessuto connettivo, principalmente collagene e fibroblasti, avviluppato con le cellule pacemaker specializzate. La figura 2.2 rivela la posizione del SAN tramite la colorazione tricromatica di Masson [22]: oltre alla grande quantità di tessuto connettivo (colorato in blu, mentre i miociti sono colorati in viola/rosa), il SAN è chiaramente identificabile sulla base della presenza dell'arteria del nodo senoatriale [22]. Studi precedenti hanno suggerito che oltre il 90% dei cuori possiede un solo ramo arterioso che porta sangue al SAN, ed è comunemente accettato che sia la coronaria destra a provvedere al nodo del seno in circa il 55% dei cuori [58]. Dati più recenti, tuttavia, suggeriscono che l'arteria nodale possa prendere uno tra sei possibili percorsi diversi, e che due o più rami arteriosi verso il SAN possano essere presenti in circa il 54% dei cuori studiati anatomicamente [58]. Ciò suggerisce che vie collaterali di rifornimento di sangue siano comuni e spiega, probabilmente, la rarità di infarto del nodo senoatriale.

### 2.1.2 Cellule Paranodali

Recenti studi [22] hanno descritto un insieme di cellule, note come le cellule paranodali, che sono elettricamente e istologicamente distinte dal nodo del seno. Esso consiste in una zona discreta, composto da miociti scarsamente compattati, vicina ma non in continuità con il SAN, come mostrato in figura 2.2. Prove di immunofluorescenza hanno dimostrato che tale area consiste in una miscela di miociti che esprimono e non esprimono due proteine marker: la connessina 43 (Cx43), che è responsabile dell'accoppiamento elettrico tra i miociti cardiaci, ed il peptide natriuretico atriale, l'ormone secreto dal muscolo atriale. Sia la Cx43 che il ANP sono noti essere assenti dal nodo senoatriale, ma abbondantemente



**Figura 2.2:** Figura tratta da Chandler et al. [22]: colorazione tricromatica di Masson della sezione di tessuto circostante il nodo senoatriale umano. Sono evidenziati: in blu il tessuto connettivo; in viola/rosa i miociti contrattili.

espressi nell'atrio nell'uomo [22]. Quindi, mentre nel SAN non vi sono Cx43 e ANP e nel muscolo atriale vi sono entrambi, nell'area paranodale vi è una miscela eterogenea di miociti, alcuni dei quali esprimono Cx43 e ANP e altri non lo fanno [22]. Allo stato attuale, il ruolo dell'area paranodale si può soltanto ipotizzare: può facilitare l'uscita del potenziale d'azione dal SAN nel muscolo atriale [22]. Tuttavia, è opportuno ricordare che sulle cellule di questa area non sono stati finora eseguiti studi funzionali e, quindi, da questo punto di vista, il significato della scoperta anatomica rimane non del tutto chiaro [82].

## 2.2 Espressione genica

Negli ultimi anni, notevoli progressi nella conoscenza del genoma dei mammiferi (ad esempio topo<sup>1</sup> e uomo<sup>2</sup>) hanno portato all'identificazione del completo repertorio genomico di canali ionici. Come questo repertorio venga espresso

<sup>1</sup>FANTOM Consortium, Okazaki et al. [96].

<sup>2</sup>International Human Genome Sequencing Consortium, Lander et al. [65].

nelle specifiche regioni del cuore e in quale modo sia legato alle funzioni fisiologiche del tessuto (ad esempio l'automaticità) o agli stati patologici (ad esempio la sindrome del nodo del seno, altrimenti detta sindrome bradi-tachicardica o sindrome del nodo malato) sono questioni importanti da affrontare per valutare i determinanti molecolari delle proprietà elettriche cellulari e le basi molecolari delle correnti ioniche coinvolte.

È possibile analizzare i pattern d'espressione genica dopo aver isolato l'RNA contenuto nelle cellule tramite appositi kit<sup>3</sup>. Di seguito si utilizzano specifici kit<sup>4</sup> per retro-trascrivere l'RNA e ottenere il DNA complementare (cDNA) per la successiva analisi in PCR quantitativa (qPCR) tramite appositi strumenti<sup>5</sup>. Grazie alla qPCR si determinano le quantità relative dei frammenti di cDNA selezionati, normalizzate, per esempio, rispetto alla quantità del gene ribosomiale 28S utilizzato come riferimento. Noti i livelli di espressione dei geni, è possibile osservare se esistano precisi cluster a seconda del tessuto preso in esame (nodo seno atriale, miociti atriali, miociti ventricolari).

### 2.2.1 Chandler et al. 2009

Allo scopo di stabilire l'"architettura molecolare" del nodo senoatriale umano (cosa già chiarita nei casi del coniglio [118] e del topo [78]), nel 2009 Chandler et al. [22] hanno svolto un approfondito lavoro sui profili di espressione dei canali ionici, delle proteine del sistema di gestione del calcio intracellulare, della proteina connessina e dei recettori di membrana nel nodo senoatriale umano (da campioni di tessuto ottenuti da cuori sani). In particolare, hanno evidenziato accuratamente le specifiche differenze di espressione tra SAN e atrio destro e distinto, nell'atrio

<sup>3</sup>Si veda come esempio il kit di Qiagen® [5].

<sup>4</sup>Si veda come esempio il prodotto di Invitrogen™[3].

<sup>5</sup>Si veda come esempio il prodotto di Applied Biosystems® [1].

destro, l'area paranodale (PN), regione *SAN-like* anatomicamente separata e che mostra un fenotipo di espressione intermedio.

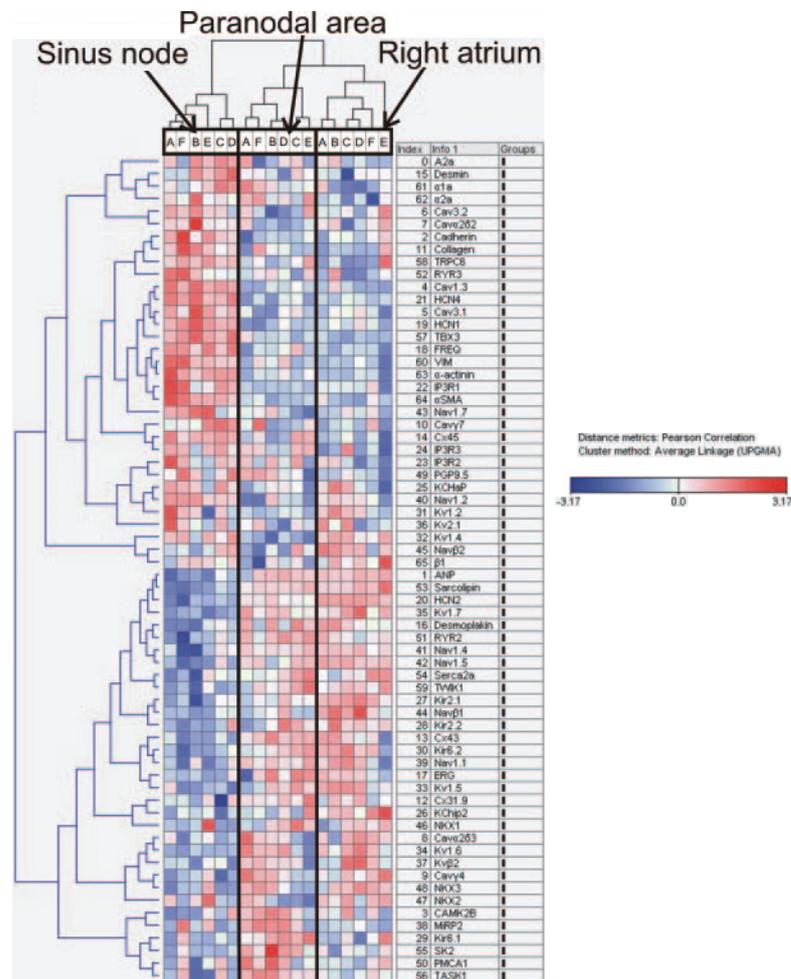
Gli autori hanno misurato i livelli di mRNA di circa 120 geni (elencati nel materiale supplementare del lavoro [22]) e discusso come varia, a seconda del tessuto, l'espressione di quelli relativi ai principali canali ionici e proteine, qui riportati in tabella 2.1.

CORRENTE IONICA	CANALE IONICO	MIOCITI ATRIALI	NODO SENOATRIALE	AREA PARANODALE
$I_{Na}$	$Na_v1.5$	$1.34 \times 10^{-4}$	$8.50 \times 10^{-6}$	$6.73 \times 10^{-5}$
$I_{CaL}$	$Ca_v1.2$	$9.42 \times 10^{-5}$	$5.59 \times 10^{-5}$	$8.87 \times 10^{-5}$
	$Ca_v1.3$	$3.82 \times 10^{-6}$	$10.6 \times 10^{-6}$	$4.28 \times 10^{-6}$
$I_{to}$	$K_v4.3$	$5.63 \times 10^{-5}$	$2.24 \times 10^{-5}$	$3.56 \times 10^{-5}$
$I_{Kur}$	$K_v1.5$	$1.06 \times 10^{-5}$	$2.75 \times 10^{-6}$	$8.67 \times 10^{-6}$
$I_{Kr}$	ERG	$6.75 \times 10^{-5}$	$3.03 \times 10^{-5}$	$7.40 \times 10^{-5}$
$I_{Ks}$	$K_vLQT1$	$1.01 \times 10^{-5}$	$6.99 \times 10^{-6}$	$9.07 \times 10^{-6}$
$I_{K1}$	$K_{ir}2.1$	$8.00 \times 10^{-5}$	$2.07 \times 10^{-5}$	$4.36 \times 10^{-5}$
	$K_{ir}2.2$	$7.21 \times 10^{-6}$	$5.03 \times 10^{-6}$	$8.81 \times 10^{-6}$
	$K_{ir}2.3$	$2.86 \times 10^{-5}$	$1.71 \times 10^{-5}$	$3.49 \times 10^{-5}$
$I_{NaCa}$	NCX1	$2.00 \times 10^{-4}$	$1.47 \times 10^{-4}$	$1.69 \times 10^{-4}$
$I_{Ca,rel}$	RyR2	$3.01 \times 10^{-4}$	$9.46 \times 10^{-5}$	$3.63 \times 10^{-4}$
$I_{Ca,up}$	SERCA2a	$5.21 \times 10^{-4}$	$1.58 \times 10^{-4}$	$4.98 \times 10^{-4}$

**Tabella 2.1:** Dati tratti da Chandler et al. [22]: livelli individuali di mRNA dei principali canali ionici, normalizzati rispetto all'mRNA di riferimento 28S.

Attraverso un'analisi di clustering gerarchico a due vie (con distanza di Pearson) per tutti i trascritti, viene mostrato che il SAN è chiaramente distinto dagli altri due tessuti. Il clustering di un sottoinsieme di 66 dei circa 120 trascritti suddivide i campioni in 3 gruppi di tessuto (figura 2.3).

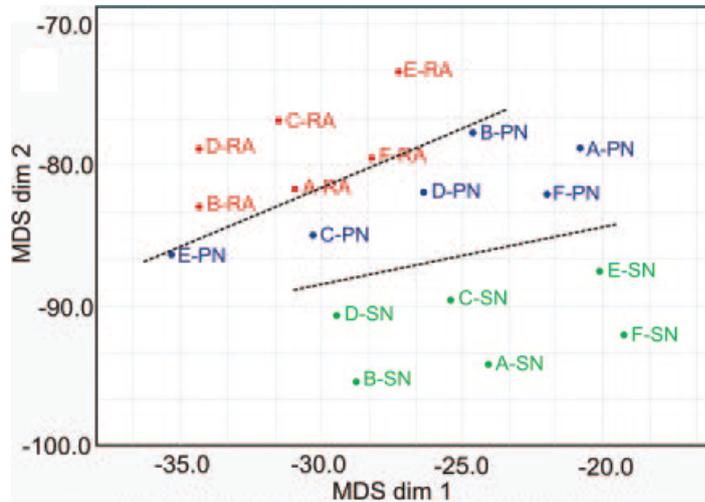
Anche il corrispondente grafico di scaling multidimensionale (con distanza euclidea) dei 66 trascritti dimostra che i campioni sono chiaramente clusterizzati



**Figura 2.3:** Figura tratta da Chandler et al. [22]: analisi di clustering gerarchico a due vie dei trascritti di mRNA. I colori rosso e blu indicano rispettivamente sovraespressione e sottoespressione rispetto alla media (bianco). Gli alberi sopra e a lato rappresentano misure di similarità tra i tessuti e di correlazione tra i geni.

secondo il tipo di tessuto (figura 2.4).

Tali analisi confermano che il nodo senoatriale è ben distinto, del punto di vista dell'espressione genica, sia dall'area paranodale che dall'atrio destro, con l'area PN intermedia tra gli altri due. Questo è pienamente in accordo con la peculiarità delle proprietà e funzioni del tessuto atriale specializzato rispetto al tessuto non



**Figura 2.4:** Figura tratta da Chandler et al. [22]: grafico di scaling multidimensionale dei trascritti di mRNA.

specializzato circostante.

Per esaminare le conseguenze funzionali del pattern unico di espressione di canali ionici del SAN umano sull'attività elettrica in tale tessuto, Chandler et al. ne hanno ricavato un modello matematico di potenziale d'azione. Hanno assunto che la conduttanza complessiva per una particolare corrente ionica fosse approssimativamente proporzionale al livello di uno o più mRNA responsabili del canale ionico di pertinenza, ignorando tuttavia una possibile non-linearità della relazione tra la quantità di trascritto e la conduttanza. Per ciascuna delle principali correnti ( $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ), è stata calcolata la somma degli mRNA rilevanti nel nodo senoatriale ed espressa in percentuale della somma degli stessi mRNA calcolati nell'atrio (tabella 2.2). Successivamente, tenendo conto dell'ipotesi di partenza, le stesse percentuali sono state assunte valide per i valori delle conduttanze ioniche nel SAN rispetto quelle in atrio. Ad esempio, nel nodo senoatriale umano, il livello di mRNA di  $Na_v1.5$  (responsabile per  $I_{Na}$ ) calcolato è il 6% di quello del muscolo atriale: è stato presupposto, pertanto, che, in un modello di potenziale d'azione di cellula SAN, anche la conduttanza della corrente  $I_{Na}$  fos-

se il 6% dell'analogia di un modello di AP di miocita atriale non specializzato. Infine, gli autori hanno ragionato allo stesso modo per le correnti generate dallo scambiatore  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  e per i flussi di rilascio e riassorbimento di  $\text{Ca}^{2+}$  da parte del reticolo sarcoplasmatico (tabella 2.2).

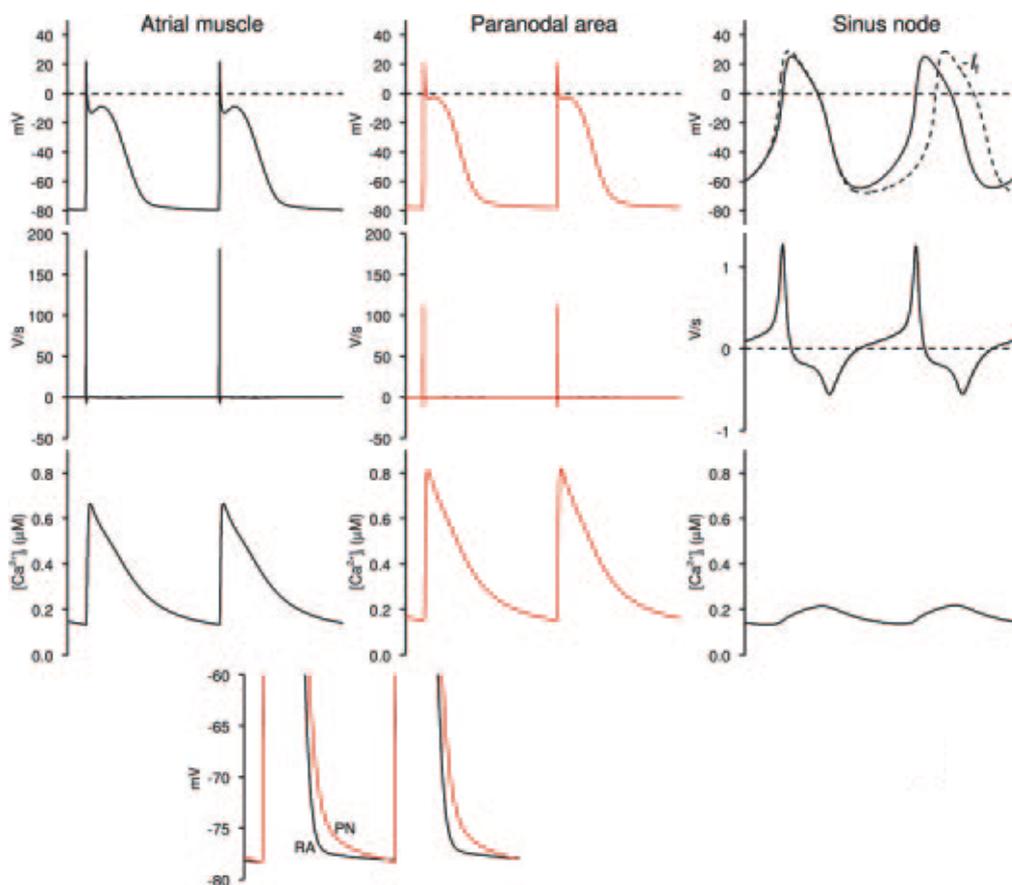
CORRENTE IONICA	CANALE IONICO	NODO SENOATRIALE	AREA PARANODALE
$I_{\text{Na}}$	$\text{Na}_v1.5$	6%	49%
$I_{\text{CaL}}$	$\text{Ca}_v1.2$	68%	95%
$I_{\text{to}}$	$\text{K}_v4.3$	40%	51%
$I_{\text{Kur}}$	$\text{K}_v1.5$	26%	82%
$I_{\text{Kr}}$	ERG	45%	110%
$I_{\text{Ks}}$	$\text{K}_v\text{LQT1}$	69%	90%
$I_{\text{K1}}$	$\text{K}_{ir}2.1$	37%	75%
$I_{\text{NaCa}}$	NCX1	74%	84%
$I_{\text{Ca,rel}}$	RyR2	31%	117%
$I_{\text{Ca,up}}$	SERCA2a	30%	96%

**Tabella 2.2:** Dati tratti da Chandler et al. [22]: percentuali di mRNA e delle conduttanze dei principali canali ionici in SAN e area PN rispetto ai miociti atriali contrattili.

Come controllo per il caso atriale, Chandler et al. hanno selezionato il modello matematico di potenziale d'azione di Courtemanche et al. [26] basato su numerosi dati elettrofisiologici di atrio umano. Poiché il nodo senoatriale umano esprime gli mRNA responsabili per  $I_{\text{CaT}}$  e  $I_{\text{f}}$  (si veda la figura 2I-L del paper [22]) e a causa dell'assenza di queste correnti nel modello scelto, gli autori hanno introdotto le formulazioni per  $I_{\text{CaT}}$  e  $I_{\text{f}}$ , tratte rispettivamente da Zhang et al. [141] e Verkerk et al. [125]. La conduttanza per  $I_{\text{CaT}}$  è stata assunta uguale a quella delle cellule SAN di coniglio [141] e la conduttanza per  $I_{\text{f}}$  è stata presa dallo studio su cellule SAN umane di Verkerk et al. [125]. Secondo questo approccio, quindi, Chandler et al. hanno simulato l'attività elettrica del SAN umano mediante la trasformazione di

9 correnti ioniche e di 3 proteine del calcium-handling (tabella 2.2) nel modello di partenza.

Il potenziale d'azione atriale umano calcolato dal modello di Courtemanche et al. non modificato e il potenziale d'azione di SAN umano calcolato come descritto sopra sono mostrati in figura 2.5. Sono inoltre raffigurate la derivata del potenziale d'azione e i transienti di calcio intracellulare sottostanti.



**Figura 2.5:** Figura tratta da Chandler et al. [22]: potenziali d'azione atriale del modello Courtemanche et al. e dell'area paranodale e nodo senoatriale calcolati da Chandler e collaboratori. Sono raffigurati, per ciascuno, la derivata dell'AP e il transiente di calcio, insieme ad un ingrandimento degli AP atriale e paranodale sovrapposti.

Il tracciato risultante è un tipico potenziale d'azione oscillante con una ridotta ve-

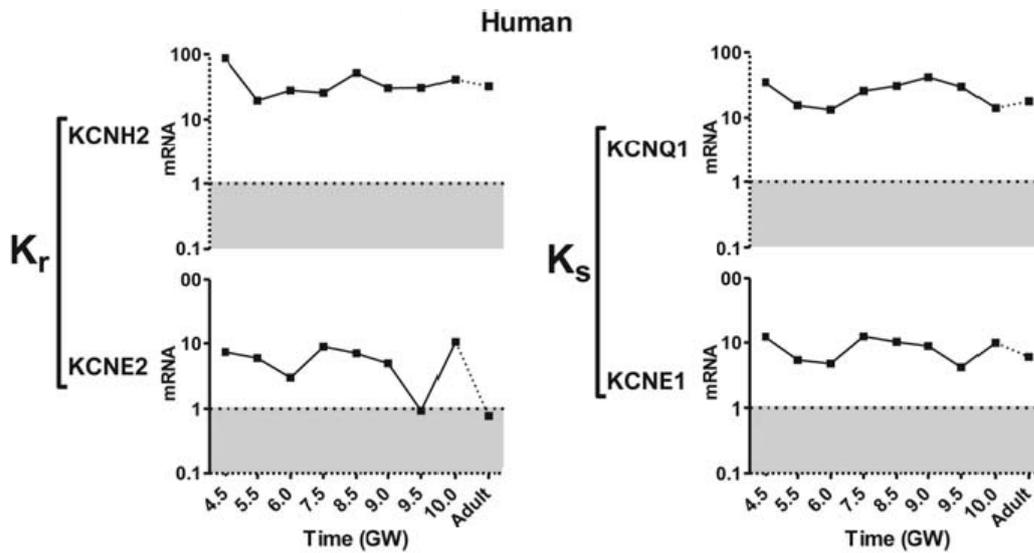
locità nella fase di upstroke ed è stato ottenuto soltanto quando tutte le 9 correnti ioniche sono state modificate. La figura 2.5 mostra inoltre che, conseguentemente al blocco di  $I_f$ , il pacemaking è stato rallentato, come osservato nelle cellule SAN umane [130]. Infine il potenziale d'azione dell'area paranodale è stato modellato allo stesso modo del potenziale d'azione SAN (figura 2.5). Rispetto al potenziale d'azione non modificato, l'ampiezza e la velocità di salita sono ridotti e la membrana tende a depolarizzarsi durante la diastole (figura 2.5, ultimo pannello).

Gli autori concludono che il loro studio mostra tre distinti pattern di espressione molecolare per le diverse aree tissutali indagate, e che il pattern d'espressione del nodo senoatriale è esclusivo per il pacemaking.

### 2.2.2 Danielsson et al. 2013

Nel 2013 Danielsson et al. [28] hanno lavorato ad un confronto sui canali ionici relativi alle correnti  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  tra specie animali diverse (uomo, topo e coniglio) e tra età diverse (stadi embrio-fetali e adulto) dei campioni di tessuto cardiaco raccolti. I campioni umani agli stadi embrio-fetali (tra 4.5 e 10 settimane gestazionali (GW, *Gestational Week*)), sono stati ottenuti in seguito ad aborto del primo trimestre, tramite la tecnica dell'aspirazione a vuoto; quelli adulti sono stati invece ottenuti durante intervento di chirurgia a cuore aperto. Soltanto le cellule spontaneamente battenti sono state selezionate per le misurazioni.

Per quanto riguarda i livelli di espressione di mRNA, i trascritti dei geni *KCNH2* e *KCNE2* codificanti per le subunità che compongono il canale di  $I_{Kr}$  ed i trascritti dei geni *KCNQ1* e *KCNE1* codificanti per le subunità che compongono il canale di  $I_{Ks}$  sono risultati comparabili tra loro e si mantengono sostanzialmente stabili durante lo sviluppo del cuore dal livello embrionale a quello adulto come evidenziato in figura 2.6.



**Figura 2.6:** Figura tratta da Danielsson et al. [28]: livelli di mRNA dei trascritti dei geni codificanti per i canali responsabili per  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  in cellule umane.

### 2.3 Elettrofisiologia

L'attività di pacemaking del nodo senoatriale è stata ampiamente studiata in animali da laboratorio di varie specie, ma risulta praticamente inesplorata nell'uomo. Negli studi su animali, perlopiù condotti su cuore di coniglio, le proprietà elettrofisiologiche delle cellule nodali senoatriali sono state determinate in dettaglio e le principali correnti ioniche sottostanti all'attività pacemaker sono state individuate e caratterizzate. Al contrario, l'elettrofisiologia delle cellule SAN umane adulte è praticamente inesplorata, in quanto i cuori espantati ottenuti durante i trapianti cardiaci, che costituiscono la maggiore fonte di miociti umani, non contengono la regione del nodo del seno, perché questa è solitamente lasciata, insieme alla vena cava superiore e la porzione postero-laterale dell'atrio destro, nella propria sede nel torace del ricevente. Esistono, tuttavia, esperimenti su campioni di tessuto nodale umano isolati da cuori in fase fetale e ottenuti in seguito a casi di interruzione di gravidanza o aborto terapeutico. Il cuore embrionale è un

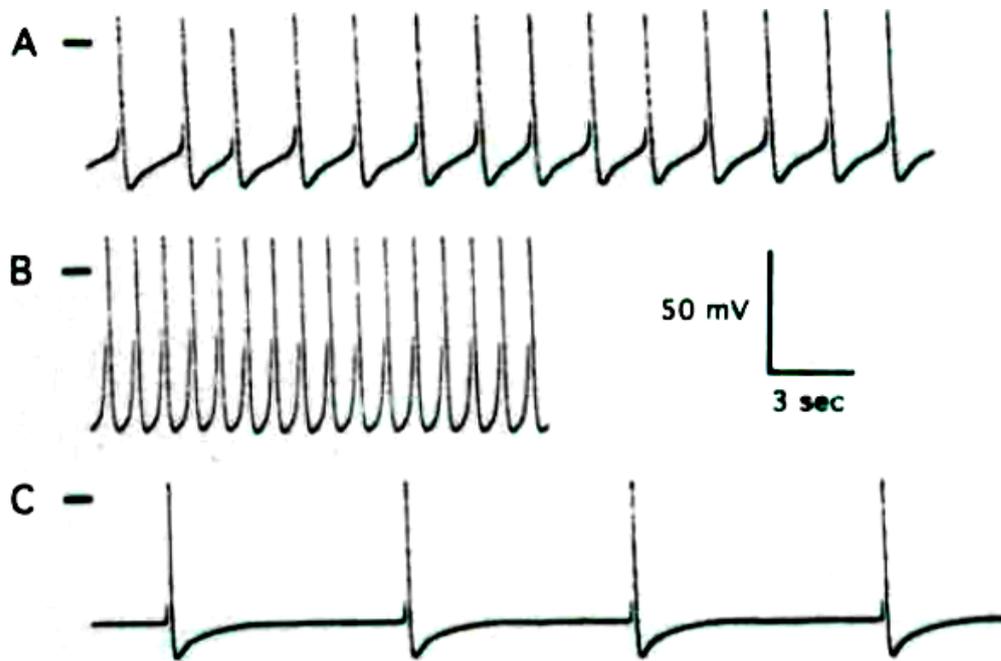
tubo cardiaco in cui tutti i cardiomiociti che lo compongono mostrano automaticità e bassa velocità di conduzione, proprietà tipiche del tessuto nodale. Dopo la successiva differenziazione del tessuto in miociti specificatamente contrattili, che permette lo sviluppo iniziale delle camere cardiache, il tessuto dalle proprietà autoritmiche rimane una struttura estesa e non ben definita. Inoltre, anche nella fase fetale in cui il sistema di conduzione del cuore può essere considerato maturo (circa dalla sedicesima settimana gestazionale), esistono differenze sostanziali rispetto al cuore adulto (una tra tutte è il valore della frequenza cardiaca basale, che varia tra i 110 e 160 bpm in un cuore fetale). Per questi motivi, i dati elettrofisiologici provenienti da studi di questo tipo sono da considerare con le giuste proporzioni.

### 2.3.1 Drouin 1997

Nel 1997 è stato pubblicato il lavoro di Emmanuel Drouin [35] in cui sono presentate, per la prima volta, registrazioni di potenziali d'azione in cellule SAN umane adulte. Nello studio sono state utilizzate preparazioni di tessuto ottenute da quattro pazienti con infarto miocardico del ventricolo sinistro, che hanno subito una cardiectomia totale al momento del trapianto. Sono state effettuate misurazioni in condizioni di controllo (figura 2.7A) e in seguito a somministrazione di isoproterenolo (Iso) (figura 2.7B) e i parametri dei potenziali d'azione registrati sono riassunti in tabella 2.3.

L'isoproterenolo è un farmaco simpatico-mimetico attivo sui recettori beta adrenergici e dotato di effetto cronotropo positivo: esso produce variazioni significative nei valori di  $APD_{90}$  e CL e induce, inoltre, iperpolarizzazione delle cellule.

Drouin ha effettuato infine registrazioni in seguito a infusione di acetilcolina (ACh)  $10^{-7}$  M (figura 2.7C): non vengono riportati i parametri numerici dell'AP, ma è commentato il fatto che l'ACh causa iperpolarizzazione delle cellule e aumento



**Figura 2.7:** Figura tratta da Drouin [35]: potenziale d'azione di SAN umano in controllo (A), in seguito a somministrazione di isoproterenolo (B) e acetilcolina (C).

	CONTROL	ISO $10^{-6}$ M
MDP (mV)	$-62.5 \pm 4.7$	$-66.0 \pm 5.3$
APD <sub>90</sub> (ms)	$308.7 \pm 15.5$	$243.3 \pm 11.5$
OS (mV)	$9.8 \pm 2.7$	$10.1 \pm 2.0$
AV (mV)	$48.5 \pm 6.0$	$50.3 \pm 3.5$
APA (mV)	$72.0 \pm 2.9$	$79.0 \pm 6.6$
V <sub>max</sub> (V/s)	$5.4 \pm 2.2$	$12.0 \pm 5.8$
CL (s)	$2.3 \pm 0.3$	$0.7 \pm 0.3$

**Tabella 2.3:** Dati tratti da Drouin [35]: parametri di AP di SAN umano in condizioni control e con isoproterenolo.

pronunciato del CL (l'acetilcolina è un neurotrasmettitore del sistema parasimpatico con effetto cronotropo negativo).

La frequenza cardiaca intrinseca delle cellule descritta in questo studio risulta in-

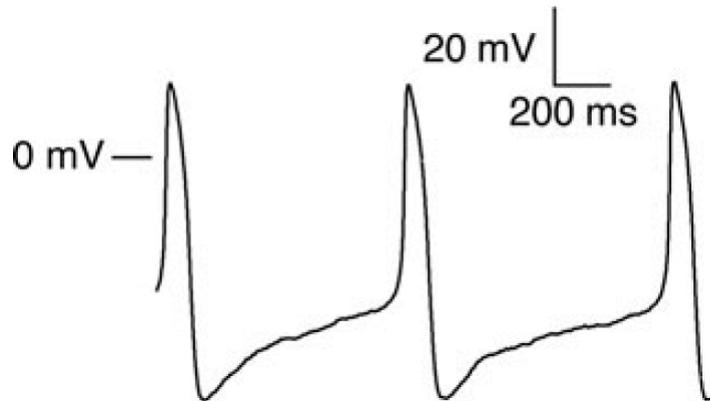
coerente rispetto alle osservazioni cliniche: la frequenza in vitro, in condizioni di completa denervazione, è minore di quella registrata in situ prima del trapianto cardiaco (tra 70 e 112 battiti al minuto, che corrisponde a un range di circa 860-535 ms di cycle length, valori ben lontani dal  $CL = 2.3 \pm 0.3$  riportato in tabella 2.3). Jose e Collison [55] hanno dimostrato che il nodo senoatriale umano farmacologicamente denervato produce un ritmo più rapido rispetto al suo omologo innervato, confermando la prevalenza del tono parasimpatico su quello simpatico nel mantenimento della frequenza cardiaca a riposo negli esseri umani. A tal proposito Drouin cerca di spiegare i risultati da lui ottenuti ponendo l'attenzione sulla potenziale influenza dell'infarto miocardico ventricolare sui parametri elettrofisiologici delle cellule SAN misurati in vitro.

### 2.3.2 Verkerk et al. 2007 a

Nonostante il valore del cycle length, i restanti parametri riportati da Drouin, risultano in linea con quelli presentati in un lavoro molto più recente ad opera di Verkerk et al. [130]. Nel 2007 essi hanno studiato le proprietà elettrofisiologiche di tre cellule umane isolate dal nodo senoatriale precedentemente asportato da una paziente con tachicardia parossistica e registrato potenziali d'azione e corrente  $I_f$  utilizzando la tecnica del whole-cell patch-clamp in current-clamp e voltage-clamp rispettivamente.

Le singole cellule hanno mostrato una firing rate spontanea di  $73 \pm 3$  battiti/min con una evidente fase di lenta depolarizzazione diastolica. Morfologia e parametri del potenziale d'azione sono mostrati in figura 2.8 e in tabella 2.4.

La corrente  $I_f$  è stata identificata in esperimenti di voltage-clamp, con gradini di potenziale iperpolarizzanti da -40 mV a -130 mV, come corrente entrante e cesio-sensitiva (figura 2.9A). Le curve rappresentative della cinetica di (de)attivazione sono presentate in figura 2.9C: i dati della (de)attivazione voltaggio-dipendente



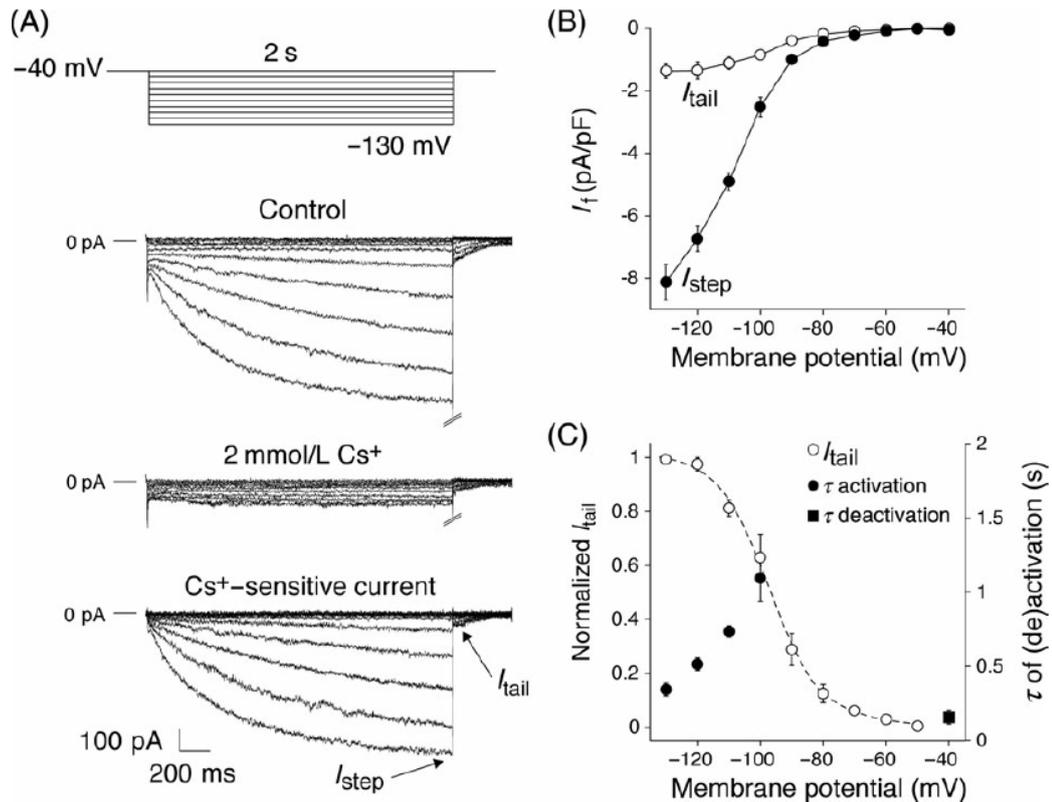
**Figura 2.8:** Figura tratta da Verkerk et al. [130]: potenziale d'azione di cellula SAN umana.

MORFOLOGIA	
Cell length ( $\mu\text{m}$ )	$66.7 \pm 6.3$
Cell width ( $\mu\text{m}$ )	$7.8 \pm 0.4$
ELETTROFISIOLOGIA	
$C_m$ (pF)	$56.6 \pm 8.7$
CL (ms)	$828 \pm 15$
MDP (mV)	$-61.7 \pm 4.3$
DDR <sub>100</sub> (mV/s)	$48.9 \pm 18$
$V_{\text{max}}$ (V/s)	$4.6 \pm 1.2$
APA (mV)	$78.0 \pm 4.5$
OS (mV)	$16.4 \pm 0.7$
APD <sub>20</sub> (ms)	$64.9 \pm 16.9$
APD <sub>50</sub> (ms)	$101.5 \pm 27.0$
APD <sub>90</sub> (ms)	$143.5 \pm 34.9$

**Tabella 2.4:** Dati tratti da Verkerk et al. [130]: morfologia ed elettrofisiologia di cellula SAN umana ( $C_m$ , capacità equivalente di membrana; DDR<sub>100</sub>, pendenza della fase DD nei primi 100 ms a partire dall'MDP).

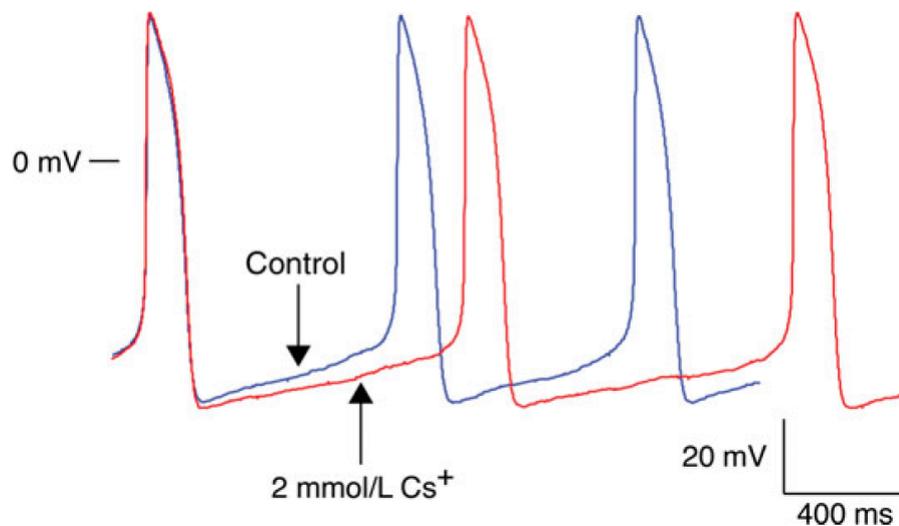
sono i valori di  $I_{\text{tail}}$  (figura 2.9B) normalizzati; i dati della costante di tempo sono ottenuti da fitting monoesponenziale dei tracciati di  $I_{\text{step}}$  e  $I_{\text{tail}}$  (figura 2.9A in

basso). Inoltre gli autori hanno riportato una conduttanza massima ( $g_f$ ) di  $75.2 \pm 3.8$  pS/pF e un potenziale di inversione ( $E_f$ ) di  $-22.1 \pm 2.4$  mV, mentre il potenziale di metà attivazione ( $V_{1/2}$ ) e lo slope factor ( $s$ ) dell'equazione di Boltzmann per la curva di (de)attivazione sono rispettivamente  $-96.9 \pm 2.7$  mV e  $-8.8 \pm 0.5$ .



**Figura 2.9:** Figura tratta da Verkerk et al. [130]: A, misurazione della corrente  $I_f$  tramite sottrazione dei tracciati registrati in assenza e in presenza di Cs<sup>+</sup>; B, correnti  $I_{step}$  e  $I_{tail}$  di  $I_f$ ; C, curva steady-state e costante di tempo di (de)attivazione.

In figura 2.10 è infine mostrato l'effetto dell'applicazione di Cs<sup>+</sup> (2 mmol/L) sul potenziale d'azione: si osserva un rallentamento dell'attività pacemaker (aumento del cycle-length del 26%) dovuto ad una diminuzione della pendenza durante la fase di depolarizzazione diastolica, mentre l'overshoot e la durata dell'AP restano inalterati.



**Figura 2.10:** Figura tratta da Verkerk et al. [130]: effetto dell'applicazione di 2 mM  $\text{Cs}^+$  sul potenziale d'azione di cellula SAN umana.

### 2.3.3 Verkerk et al. 2007 b

In un lavoro dello stesso anno [125], Verkerk et al. osservano che, anche se il contributo relativo delle singole correnti ioniche alla depolarizzazione diastolica rimane una questione di dibattito, studi su animali hanno dimostrato che  $I_f$  gioca un ruolo chiave. Tuttavia, non vi è alcuna prova diretta che  $I_f$  giochi lo stesso ruolo funzionale anche nel pacemaking del nodo senoatriale umano. Inoltre, dallo studio precedente degli stessi autori, è emerso che la conduttanza  $g_f$  è molto minore di quella tipicamente misurata nel coniglio e, inoltre, il valore di  $V_{1/2}$  è circa 20 mV più negativo nell'uomo. Queste differenze sembrerebbero entrambe portare verso un ridotto ruolo funzionale di  $I_f$  nelle cellule pacemaker umane. Per valutare tale ruolo Verkerk e collaboratori hanno effettuato una ricostruzione numerica dell'evoluzione temporale di  $I_f$  durante un potenziale d'azione di SAN umano sperimentalmente registrato [130], sulla base dei dati ottenuti su ampiezza e cinetica della corrente [130].

Essi hanno calcolato  $I_f$  secondo la formula

$$I_f = y \cdot g_f \cdot (V_m - E_f) \quad (2.1)$$

dove

$$g_f = 75 \text{ pS/pF} \quad (2.2)$$

$$E_f = -22 \text{ mV} \quad (2.3)$$

mentre  $y$  evolve secondo la relazione

$$\frac{dy}{dt} = \frac{y_\infty - y}{\tau_y} \quad (2.4)$$

in cui

$$y_\infty = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{1/2} - V_m}{s}}} \quad (2.5)$$

con

$$V_{1/2} = -96.9 \text{ mV} \quad (2.6)$$

$$s = -8.8 \quad (2.7)$$

e, espressa in secondi,

$$\tau_y = \frac{1}{\alpha + \beta} + 0.054 \quad (2.8)$$

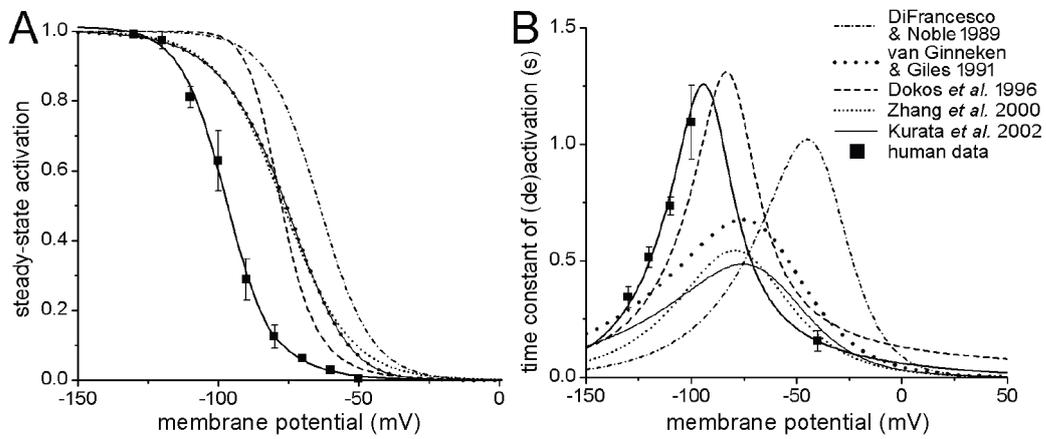
con

$$\alpha = \frac{0.36 \cdot (V_m + 148.8)}{e^{0.066 \cdot (V_m + 148.8)} - 1} \quad (2.9)$$

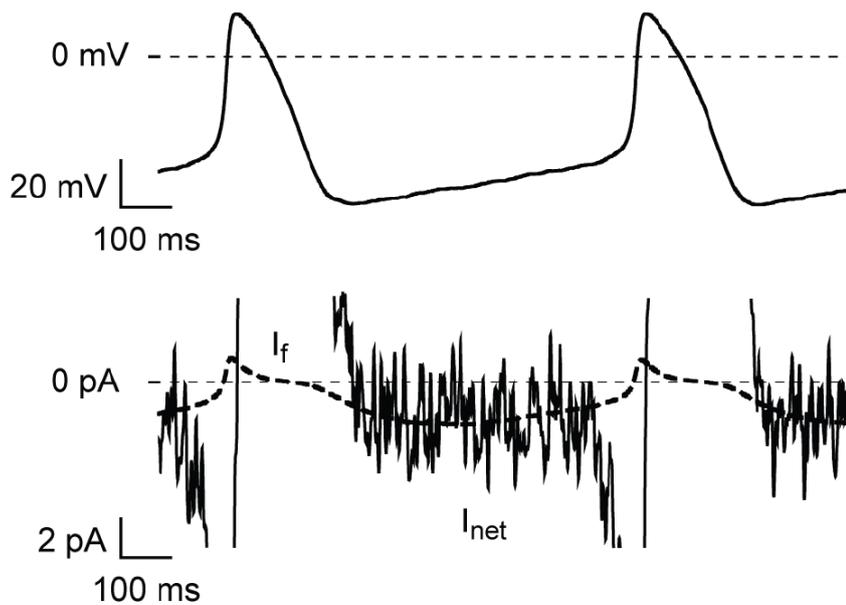
$$\beta = \frac{0.1 \cdot (V_m + 87.3)}{1 - e^{-0.21 \cdot (V_m + 78.3)}} \quad (2.10)$$

Le curve  $y_\infty$  e  $\tau_y$  sono mostrate in figura 2.11 A e B rispettivamente.

Dalla ricostruzione, e come dimostra la figura 2.12, è emerso che  $I_f$  fornisce una piccola ma significativa corrente entrante durante la fase di depolarizzazione diastolica, che risulta confrontabile con l'intensità della corrente totale  $I_{\text{net}}$ : questo suggerisce un ruolo prominente di  $I_f$  nell'attività del pacemaking cardiaco umano.



**Figura 2.11:** Figura tratta da Verkerk et al. [125]: curva di (de)attivazione (A) e costante di tempo (B) di SAN umano confrontate con quelle di altri modelli e dati sperimentali.

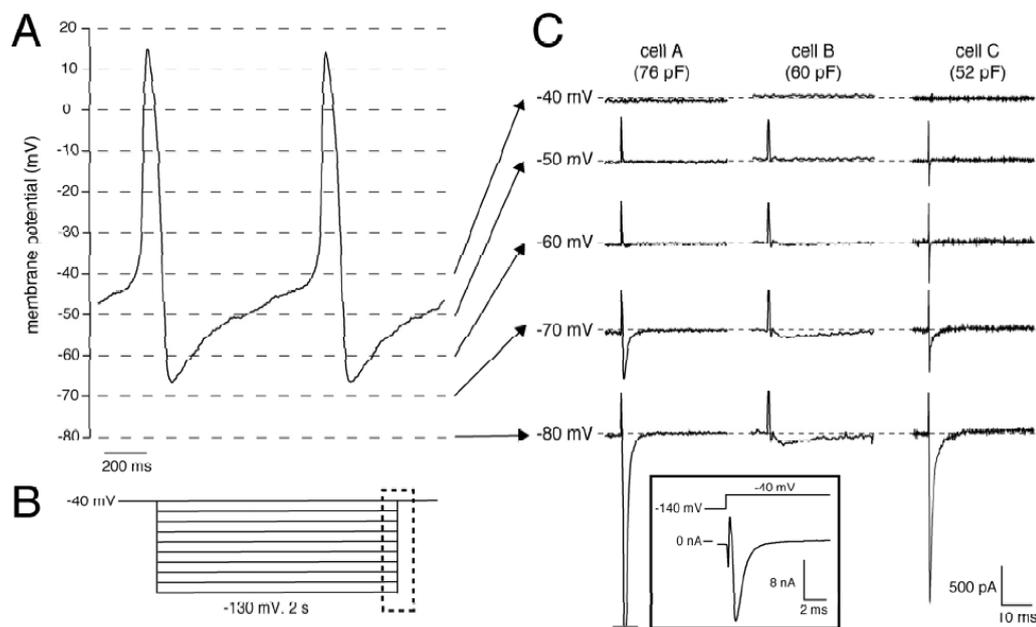


**Figura 2.12:** Figura tratta da Verkerk et al. [125]: ricostruzione numerica di  $I_f$  sottostante il potenziale d'azione di SAN umano sperimentalmente registrato.

### 2.3.4 Verkerk et al. 2009 a

Ancora Verkerk et al., nel 2009 [131], hanno osservato ampie correnti entranti che rapidamente si attivano e inattivano al termine dei gradini iperpolarizzanti

a potenziali di  $-60$  mV e più negativi, al ritorno al potenziale di holding ( $-40$  mV), in 2 delle 3 cellule analizzate negli esperimenti pubblicati nel 2007 [130], cosa che non era stata discussa in quell'anno. La figura 2.13C illustra le correnti registrate in tutte e tre le cellule: la presenza di ampie correnti nelle cellule A e C è di particolare interesse. Data la loro ampiezza ed andamento temporale, queste correnti transitorie sono molto probabilmente riconoscibili come  $I_{Na}$ , che si attiva durante il gradino depolarizzante alla fine del protocollo di voltage-clamp (riquadro tratteggiato in figura 2.13B), poiché l'inattivazione dei canali  $Na^+$  è parzialmente rimossa dall'iperpolarizzazione precedente.



**Figura 2.13:** Figura tratta da Verkerk et al. [131]: A, AP di cellula SAN umana; B, protocollo di voltage-clamp utilizzato; C, registrazioni di correnti di sodio durante il gradino depolarizzante nel riquadro tratteggiato nel pannello B.

Poiché le impostazioni di default dell'amplificatore per la registrazione da cellule SAN portavano alla saturazione di tali correnti, nella cellula A Verkerk et al. sono stati in grado di effettuare una misurazione con impostazioni adattate al caso

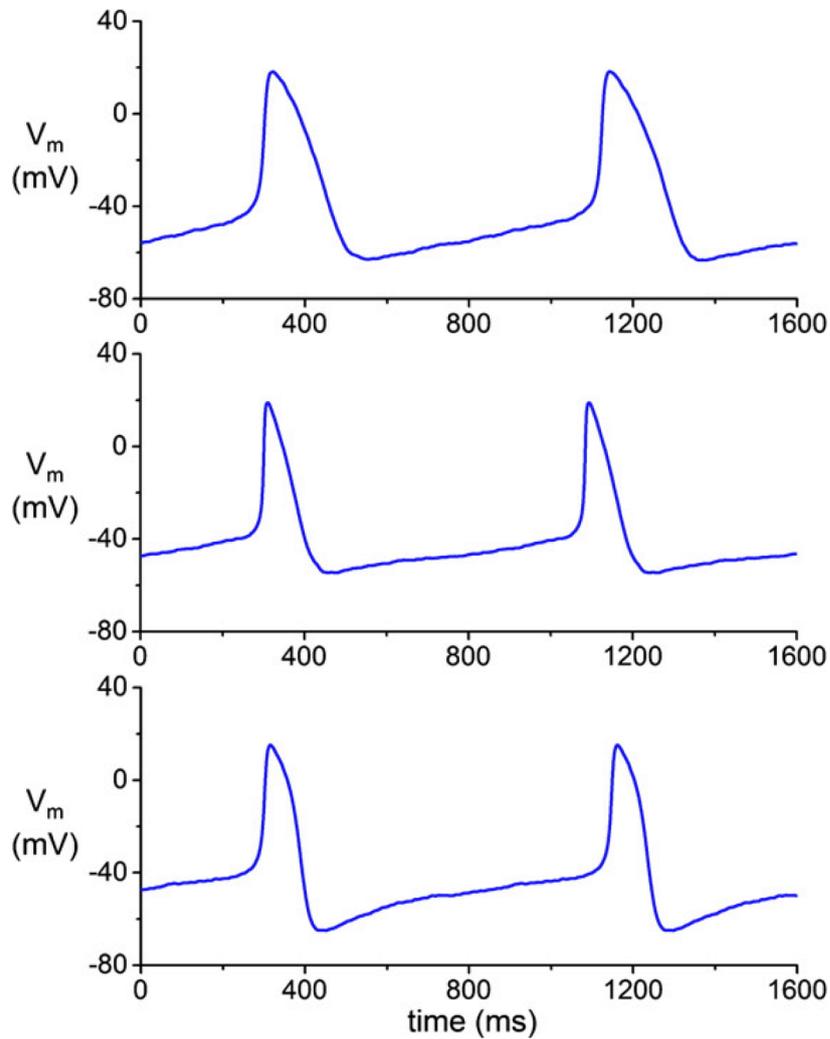
(inserto in figura 2.13C) e hanno trovato che l'ampiezza della corrente supera i 10 nA.

Le caratteristiche delle correnti osservate non sono soltanto proprie di  $I_{Na}$ , ma anche della corrente di tipo T del calcio,  $I_{CaT}$ . Gli autori sostengono che quella da loro misurata sia  $I_{Na}$  piuttosto che  $I_{CaT}$  principalmente per l'elevata ampiezza registrata, mentre, al contrario, la densità di  $I_{CaT}$  nelle cellule di nodo senoatriale risulta minore [98].

### 2.3.5 Verkerk et al. 2009 b e Verkerk e Wilders 2010

Sempre nel 2009, Verkerk e collaboratori pubblicano un lavoro di review sul ruolo della corrente  $I_f$  nell'attività pacemaker delle cellule SAN umane [127]. In esso vengono riportati i dati di Drouin del 1997 [35] e di Verkerk et al. 2007 [130] già discussi nei paragrafi precedenti. In base a questi ultimi dati, Verkerk et al. hanno potuto affermare che il fatto che la curva di attivazione di  $I_f$  in cellule SAN umane si sovrapponga al range di potenziali propri della depolarizzazione diastolica di cellule SAN umane, implica che l'attivazione di  $I_f$  contribuisce ad una corrente depolarizzante durante tale fase caratteristica nelle cellule di nodo senoatriale umano, come è stato ulteriormente dimostrato dagli effetti del bloccaggio con cesio [130] e dalla ricostruzione numerica della stessa corrente  $I_f$  durante un potenziale d'azione SAN umano [125].

Nel 2010, Verkerk e Wilders, con una lettera all'editore [128], rispondono all'articolo point/counterpoint di Lakatta e DiFrancesco [64] sul ruolo relativo della corrente funny  $I_f$  rispetto a quello della dinamica del calcio intracellulare nel controllo della normale automaticità delle cellule pacemaker. Nell'articolo, riferendosi ai dati sperimentali del laboratorio di Verkerk et al. [125, 130], Lakatta sostiene che la misura in cui  $I_f$  viene attivata durante la depolarizzazione diastolica nelle cellule del nodo senoatriale primarie deve essere bassa, in generale, ma



**Figura 2.14:** Figura adattata da Verkerk et al. [128]: potenziali d'azione registrati sperimentalmente in tre singole cellule di nodo senoatriale umano.

soprattutto negli esseri umani. Verkerk e Wilders, quindi, commentano l'ipotesi secondo cui la corrente funny sarebbe meno importante nel nodo senoatriale umano che nel coniglio riportando i risultati di simulazioni numeriche. Come previsto dalle proprietà biofisiche (minore valore della conduttanza  $g_f$  e potenziale di metà attivazione più negativo di circa 20 mV rispetto al coniglio [130]), la  $I_f$  umana, numericamente ricostruita, è considerevolmente più piccola di quella di coniglio

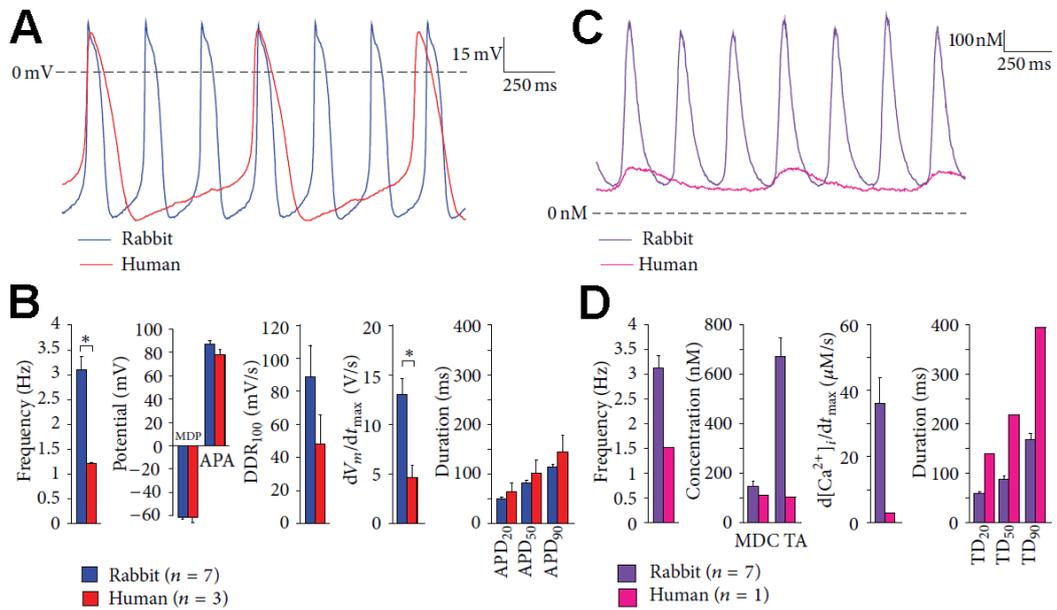
([128], figura 1). Tuttavia, è evidente la somiglianza di  $I_f$  tra uomo e coniglio se rapportata alla corrente netta di membrana: in entrambi i casi,  $I_f$  è circa della stessa entità di  $I_{net}$  durante la fase di depolarizzazione diastolica del potenziale d'azione. Verkerk e Wilders concludono che i dati disponibili sulla  $I_f$  di nodo senoatriale umano [125, 130] sono coerenti con un ruolo altrettanto importante della corrente funny nell'uomo così come nel coniglio.

Sia in Verkerk et al. 2009 b che in Verkerk e Wilders 2010, vengono mostrati i tracciati dei potenziali d'azione umani registrati nelle tre cellule di nodo senoatriale del lavoro del 2007 [130], qui riportati in figura 2.14. Disponendo di tutti e tre i tracciati è possibile confrontarli e osservare che la morfologia mette in luce una certa variabilità, in particolare nella durata del potenziale d'azione e nella pendenza della fase diastolica.

### 2.3.6 Verkerk et al. 2013

Quando, nel 2007, Verkerk e collaboratori hanno registrato potenziali d'azione di cellule pacemaker isolate da SAN umano e hanno condotto su di esse esperimenti di voltage-clamp [125, 130], hanno inoltre acquisito alcuni dati sulla concentrazione di calcio libero intracellulare delle stesse cellule utilizzando l'indicatore fluorescente Indo-1. Nel 2013 in Verkerk et al. [126], tali dati sperimentali, fino a prima mai pubblicati, sono stati presentati e successivamente utilizzati per una ricostruzione numerica della corrente dello scambiatore sodio-calcio  $I_{NaCa}$  sottostante al potenziale d'azione di cellula pacemaker di SAN umano.

I transienti di calcio sono stati caratterizzati in base ai parametri MDC (minimum diastolic  $[Ca^{2+}]_i$ ), TA (transient amplitude),  $d[Ca^{2+}]_i/dt_{max}$  (maximum rate of rise),  $TD_{20}$ ,  $TD_{50}$  e  $TD_{90}$  (transient duration al 20, 50 3 90% della discesa verso l'MDC) e frequenza. In figura 2.15, insieme al tracciato (A) e ai parametri (B) del potenziale d'azione già pubblicati in precedenza [130], sono rappresentati il



**Figura 2.15:** Figura adattata da Verkerk et al. [126]: tracciati (A) e parametri (B) del potenziale d'azione, e tracciati (C) e parametri (D) dei transienti di calcio in cellule di SAN umano e di coniglio a confronto.

tracciato (C) dei transienti di calcio intracellulare e i relativi parametri misurati (D), il tutto messo a confronto con il caso del coniglio. I valori dei parametri di  $[Ca^{2+}]_i$  del caso umano sono riportati anche in tabella 2.5.

PARAMETRI $[Ca^{2+}]_i$	
freq (Hz)	1.52
MDC (nM)	109.2
TA (nM)	103.2
d $[Ca^{2+}]_i$ /dt <sub>max</sub> (μM/s)	2.98
TD <sub>20</sub> (ms)	138.9
TD <sub>50</sub> (ms)	217.4
TD <sub>90</sub> (ms)	394.0

**Tabella 2.5:** Dati ricavati dalla figura 1D in Verkerk et al. [126]: parametri del transiente di calcio intracellulare.

Per la ricostruzione numerica della  $I_{NaCa}$  umana sulla base dei dati registrati su  $V_m$  e  $[Ca^{2+}]_i$  (utilizzati in voltage- e calcium- clamp combinati), Verkerk et al. hanno adottato la formulazione del modello Courtemanche et al. [26] di miocita atriale umano, con la conduttanza di  $I_{NaCa}$  ridotta al 74% del suo valore di controllo. Gli autori hanno quindi seguito l'approccio di Chandler et al. [22] nella loro costruzione di un modello matematico di cellula SAN umana ottenuto modificando il modello Courtemanche et al., dopo aver scalato le conduttanze delle correnti ioniche sulla base del livello relativo di espressione di mRNA in SAN e atrio per ciascuna corrente (come discusso nel paragrafo 2.2).

$I_{NaCa}$  così ottenuta (figura 2.16D) è stata confrontata con la corrente netta di membrana  $I_{net}$  e la corrente funny  $I_f$  (figura 2.16C), anch'esse ottenute attraverso una ricostruzione numerica.

Valendo l'equazione

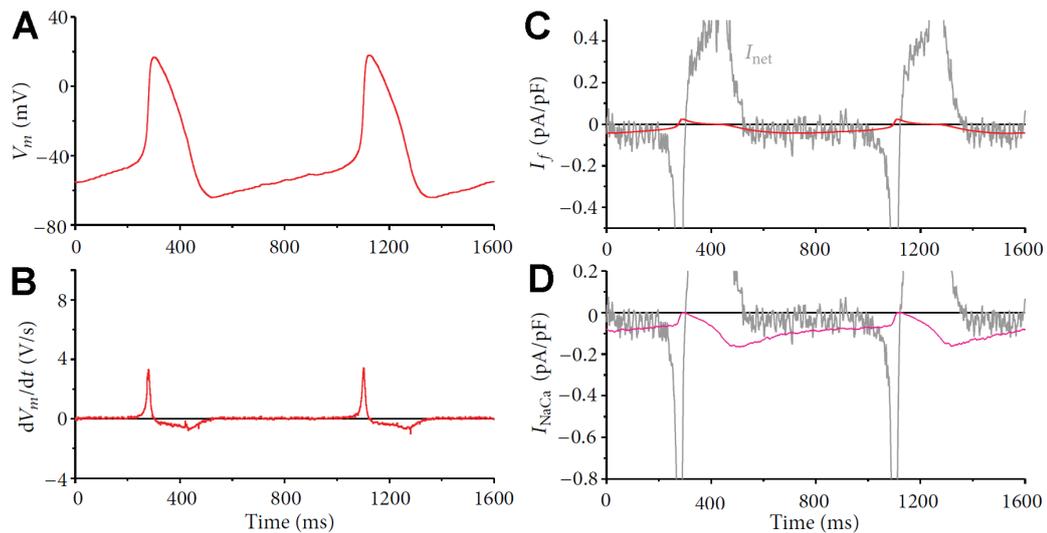
$$I_{net} = -C_m \cdot \frac{dV_m}{dt} \quad (2.11)$$

con  $C_m$  capacità di membrana,  $I_{net}$  è stata costruita a partire dalla derivata temporale di  $V_m$  (figura 2.16B) cambiata di segno. La corrente  $I_f$  è stata implementata, come già fatto in precedenza dagli stessi autori nel 2007 [125], secondo il set di equazioni (2.1)-(2.10), ma con un aggiornamento della curva di (de)attivazione steady-state tramite la nuova formulazione:

$$y_\infty = \begin{cases} 0.01329 + \frac{0.99921}{1 + e^{\frac{V_m + 97.134}{8.1752}}} & V_m < 80mV \\ 0.0002501 \cdot e^{\frac{-V_m}{12.861}} & V_m \geq 80mV \end{cases} \quad (2.12)$$

In maniera analoga a quanto fatto per i dati di nodo senoatriale umano, Verkerk e collaboratori hanno ricostruito la corrente dello scambiatore sodio-potassio anche dai dati di potenziale d'azione e transiente di calcio provenienti da cellule SAN di coniglio (figure 2.15A e C). La conclusione è che l'intensità della corrente  $I_{NaCa}$  ricostruita dai dati umani è molto inferiore rispetto al caso del coniglio e, secondo

gli autori, ciò dipende sostanzialmente dalla marcata differenza nell'ampiezza dei transienti di calcio registrati nell'uomo e nel coniglio (figura 2.15C). Tuttavia, se comparate alla corrente netta  $I_{net}$ , risultano di simile entità.

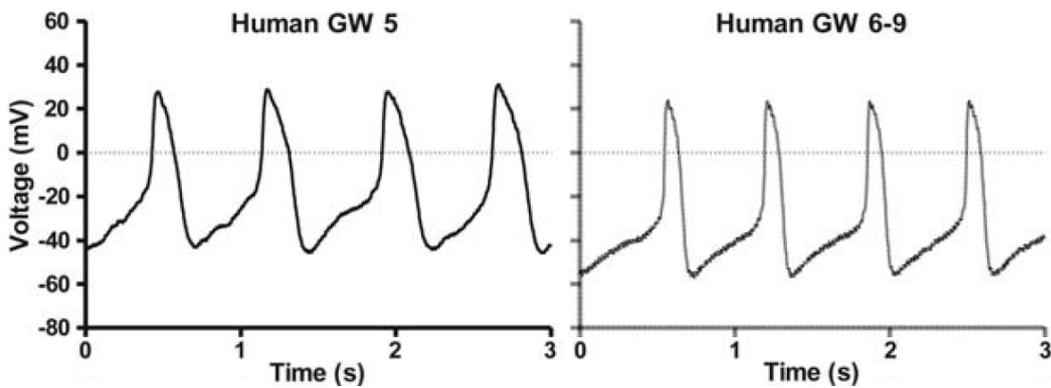


**Figura 2.16:** Figura adattata da Verkerk et al. [126]: A, potenziale d'azione sperimentalmente registrato in SAN umano; B, derivata temporale di  $V_m$ ; C e D, ricostruzioni numeriche di  $I_f$  (C) e di  $I_{NaCa}$  (D) confrontate con  $I_{net}$ .

### 2.3.7 Danielsson et al. 2013

Nel 2013 è stato inoltre pubblicato il lavoro di Danielsson et al. [28] incentrato sui canali ionici responsabili delle correnti  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  nell'uomo, topo e coniglio. Nel caso umano, gli esperimenti sono stati condotti su campioni di tessuto cardiaco a diversi stadi embrio-fetali (settimane gestazionali 4.5-10), ottenuto in seguito ad aborto del primo trimestre tramite la tecnica dell'aspirazione a vuoto. Soltanto le cellule spontaneamente battenti sono state selezionate per le misurazioni e in figura 2.17 sono mostrati due esempi di potenziale d'azione registrati.

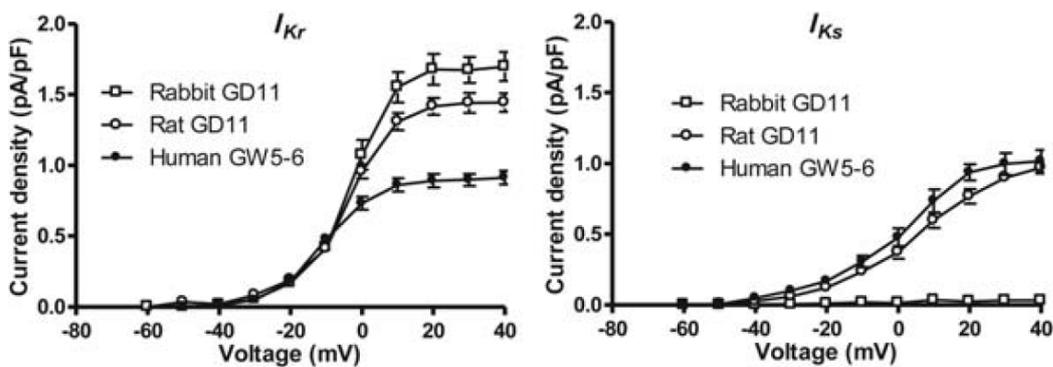
I cardiomiociti embrionali umani hanno mostrato un certo grado di variabilità nella morfologia e nei parametri del potenziale d'azione, in particolare MDP, APD



**Figura 2.17:** Figura adattata da Danielsson et al. [28]: potenziali d'azione spontanei di cellule embrionali umane.

e frequenza ([28], figura S1 del materiale supplementare): il valore di MDP varia tra -65 e -40 mV e l'OS è compreso tra +25 e +40 mV; la durata dell'AP rientra nel range 100-250 ms, mentre la frequenza è molto variabile tra 1 e 2.5 Hz.

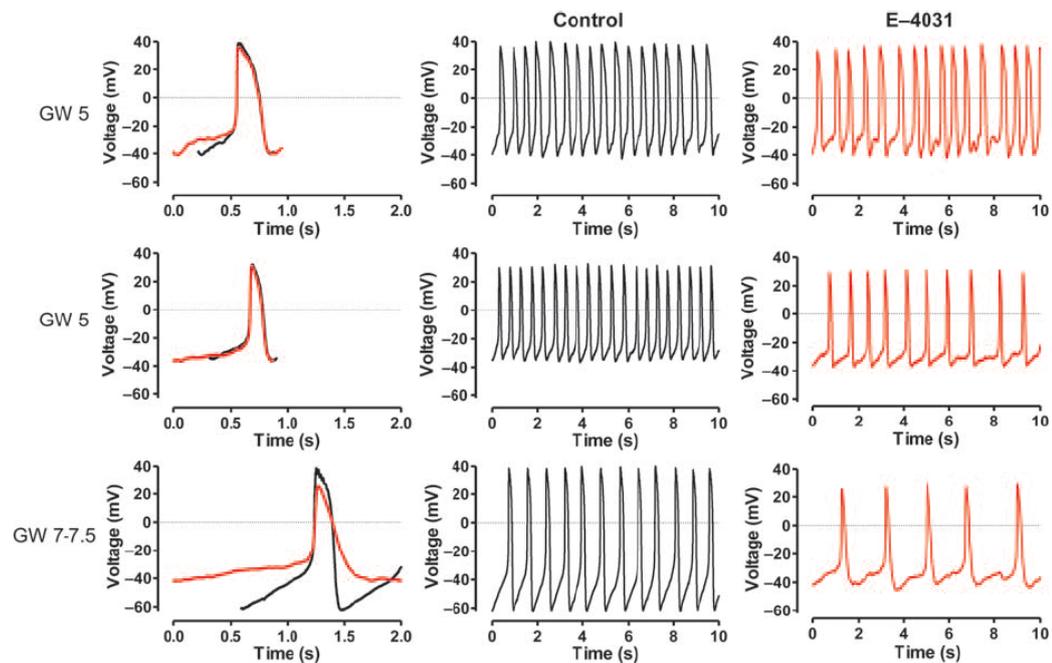
I risultati degli esperimenti di voltage-clamp per determinare la dipendenza dal voltaggio nell'attivazione delle correnti  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  umane sono presentati in figura 2.18 e confrontate con i casi di topo e coniglio.



**Figura 2.18:** Figura adattata da Danielsson et al. [28]: dipendenza dal voltaggio dell'attivazione di  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  in cellule embrionali di uomo, topo e coniglio.

Per esplorare ulteriormente il ruolo dei canali di  $I_{Kr}$ , Danielsson et al. hanno condotto esperimenti farmacologici con il bloccante selettivo per tali canali, E-4031.

La figura 2.19 mostra l'effetto di  $1 \mu\text{M}$  E-4031: le due cellule GW5 non hanno mostrato alcun prolungamento dell'APD, al contrario della cellula GW7-7.5. La seconda cellula GW5 (pannello intermedio) e la cellula GW7-7.5 hanno mostrato una diminuzione della frequenza e la cellula GW7-7.5 ha inoltre mostrato un innalzamento dell'MDP. Le variazioni medie dei parametri dell'AP (estratte dalle figure 5C-F in Danielsson et al. [28]) sono riassunte di seguito: l'MDP si depolarizza di 6 mV e il picco dell'AP si abbassa di circa 4 mV; la durata del potenziale d'azione (APD<sub>50</sub>) non varia significativamente, mentre il cycle-length aumenta del 35%.



**Figura 2.19:** Figura adattata da Danielsson et al. [28]: effetto di  $1 \mu\text{M}$  E-4031 su AP spontanei di cellule embrionali umane.



## **Capitolo 3**

# **Mutazioni geniche dei canali ionici**

### **Introduzione**

Il nodo senoatriale è una struttura anatomicamente ed elettrofisiologicamente eterogenea, che esprime un set unico di canali ionici necessario per la generazione e la propagazione del potenziale d'azione. Una funzionalità alterata del SAN può essere provocata dalla disfunzione dei canali ionici in seguito a rimodellamento in condizioni patologiche, o come risultato di mutazioni geniche [82] ereditarie o mutazioni "de novo" (i genetisti chiamano mutazione "de novo" la mutazione diagnosticata in un individuo, che non risulta essere presente nel corredo genetico dei genitori: significa che non è stata ereditata, ma è frutto di un evento "nuovo", verificatosi per la prima volta in quel soggetto).

In questo capitolo verranno introdotte alcune nozioni di base sulle mutazioni geniche e sulle linee cellulari di coltura utilizzate nei laboratori di elettrofisiologia per studiare le caratteristiche dei canali ionici mutati. Successivamente verranno presentate ed approfondite le principali mutazioni alla base delle più comuni sindromi aritmiche riscontrate nell'uomo.

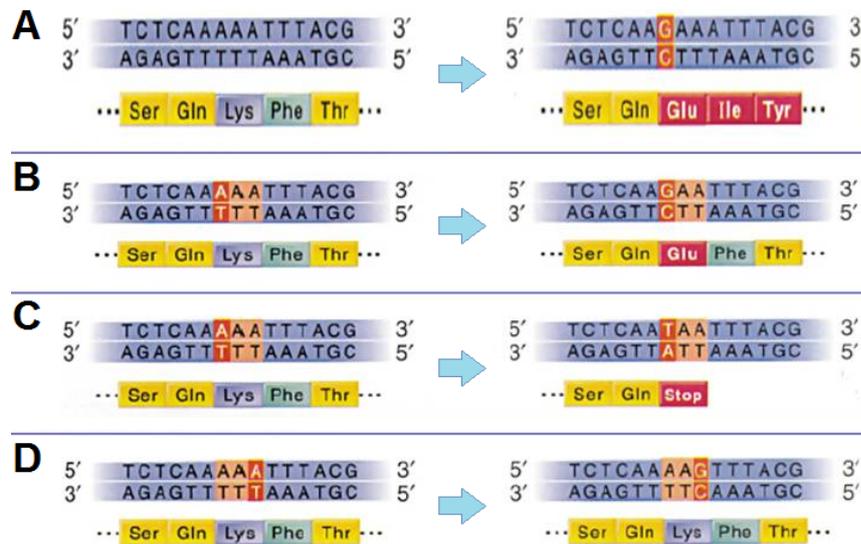
### 3.1 Mutazione genica

Per mutazione genica si intende un cambiamento della sequenza nucleotidica del DNA di un organismo che interessa singoli geni (al contrario delle mutazioni cromosomiche che coinvolgono ampi tratti di cromosomi o anche cromosomi interi e, di conseguenza, molti geni). Il cambiamento può riguardare una o poche basi azotate: nel primo caso si parla più propriamente di mutazioni puntiformi. Esse si possono verificare per sostituzione di una base o inserzione/duplicazione/delezione (frameshift).

Le sostituzioni di base si suddividono in:

- transizioni - sostituzione di una purina (A, G) con un'altra purina, o di una pirimidina (T, C) con un'altra pirimidina. È mantenuto l'orientamento purina-pirimidina nelle due eliche del DNA;
- transversioni - sostituzione di una purina con una pirimidina o viceversa. L'orientamento delle purine e pirimidine nelle due eliche è invertito.

La mutazione frameshift è dovuta a inserzione (aggiunta) o delezione (sottrazione) di una coppia di basi azotate in regioni codificanti o non [70]. Mentre nel caso della sostituzione di una base viene alterato uno solo dei codoni (triplette specifiche di tre nucleotidi), in questo caso le sequenze dei nucleotidi vengono ad avere una base in più (inserzione) o una base in meno (delezione) e le conseguenze sono in genere più gravi: a partire dal punto in cui si è verificata la mutazione, infatti, tutto il messaggio risulta alterato a causa dello sfasamento e dello slittamento della sequenza di lettura (figura 3.1 A). Se la base o sequenza inserita è identica a quella precedente si parla di duplicazione. Quando una mutazione per sostituzione di base cade nella regione codificante di un gene e modifica la sequenza di un codone, essa può generare tre situazioni con diversi effetti fenotipici [70]:



**Figura 3.1:** Esempi di mutazioni frameshift (A), missenso (B), non-senso (C) e silente (D).

- mutazione missenso - nella proteina codificata dal gene mutato si determina la sostituzione di un amminoacido con uno errato e ciò può modificare l'attività della proteina stessa (rendendola difettosa), con un effetto fenotipico da lieve a grave, a seconda dell'entità del cambiamento (figura 3.1 B);
- mutazione non-senso - la sintesi della proteina codificata subisce una terminazione anticipata per via del fatto che la tripletta modificata non codifica per alcun amminoacido e viene interpretata come codone di arresto della sintesi, per cui si ha la produzione di proteine tronche e, nella maggior parte dei casi, caratterizzate da totale perdita di funzione (figura 3.1 C);
- mutazione silente - nella proteina codificata dal gene non si osserva alcuna differenza rispetto a quella *wild-type* (forma originale), non viene modificata la sequenza aminoacidica, perché la nuova tripletta codifica per lo stesso aminoacido (se, per esempio, la mutazione riguarda una base nella terza posizione del codone, spesso l'aminoacido non cambia). Questo

è reso possibile grazie alla caratteristica di ridondanza dell'informazione genetica, perciò non si osserva alcun effetto fenotipico (figura 3.1 D).

Al contrario, le inserzioni, duplicazioni o delezioni portano quasi sempre ad un fenotipo mutante completo perché sono responsabili della sintesi di proteine gravemente alterate.

Il cambiamento fenotipico che una mutazione può determinare è, essenzialmente, di due tipi:

- *loss of function*, mutazione con perdita di funzione - il prodotto che ne deriva ha una funzione ridotta o assente;
- *gain of function*, mutazione con guadagno di funzione - il prodotto che ne deriva acquisisce una nuova funzione, anomala o potenziata.

Poiché gli organismi diploidi conservano due copie di ciascun gene, essi possono portare alleli identici, cioè essere omozigoti per un gene, oppure trasportare alleli diversi, cioè essere eterozigoti per un gene. Un allele mutante recessivo è definito come quello in cui entrambi gli alleli devono essere mutanti per far in modo che venga osservato il fenotipo mutante, ovvero l'individuo deve essere omozigote per l'allele mutante per mostrare il fenotipo mutante. Al contrario, le conseguenze fenotipiche di un allele mutante dominante si osservano in un individuo eterozigote, ovvero che porta un allele mutante e uno wild-type [70]. Anche se sono stati descritti casi in cui mutazioni loss of function sono dominanti o mutazioni gain of function sono recessive, nella stragrande maggioranza dei casi, le mutazioni recessive sono con perdita di funzione e le mutazioni dominanti sono con guadagno di funzione [9].

Infine una mutazione è detta neutra quando non ha effetto sul fenotipo e passa "inosservata". Si verifica quando:

- la tripletta mutata codifica per un amminoacido diverso che però non altera la funzione della proteina;
- la mutazione coinvolge un gene che codifica per una proteina non indispensabile;
- il gene mutato non si esprime;
- la mutazione è soppressa da un'altra mutazione.

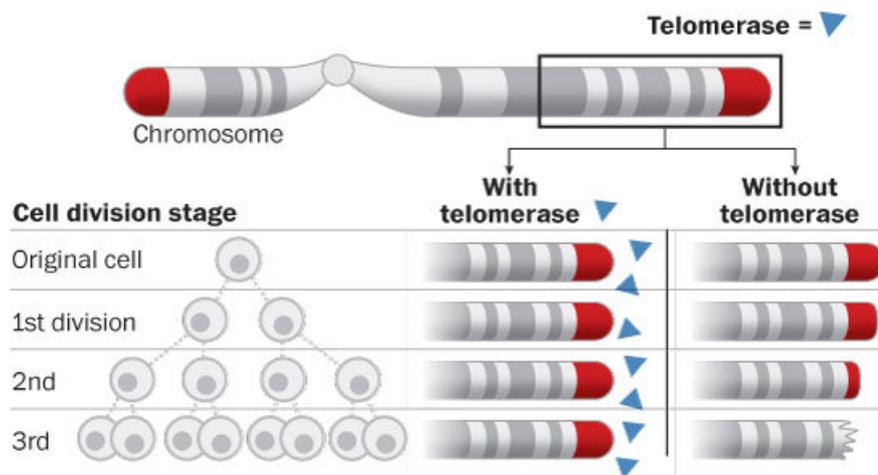
L'origine delle mutazioni può essere spontanea o indotta. Le mutazioni spontanee sono provocate da fattori chimici endogeni e da errori nei processi che si attuano sul materiale genetico. Tali errori possono essere dovuti a tautomeria (una base viene modificata per lo spostamento di un atomo di idrogeno), deaminazione (reazione che trasforma una base azotata per perdita di un gruppo amminico), depurinazione (perdita di una base azotata purinica da un nucleotide per rottura del legame glicosidico tra i due). Oltre a questi, possono esservi errori di appaiamento o di allineamento dei nucleotidi durante i processi di replicazione del DNA.

Altri danneggiamenti diretti o indiretti possono essere causati dai mutageni, ovvero fattori fisici (come le radiazioni ultraviolette o le radiazioni ionizzanti) o sostanze chimiche (per esempio i prodotti della combustione di materiale organico contenuti nel fumo delle sigarette, nei fumi di scarico dei motori a scoppio) che modificano chimicamente le basi del DNA oppure si intercalano tra i due filamenti della doppia elica modificando la "lettura" dei tratti interessati [116].

## 3.2 Linee cellulari

Le colture cellulari ottenute a partire dai tessuti, dette colture primarie, tendono a soffrire di un problema: anche se coltivate nelle migliori condizioni ambientali e nutrite con tutto quello di cui hanno bisogno, alla fine le cellule subiscono

un arresto permanente del ciclo cellulare e muoiono. La maggior parte delle cellule dei vertebrati smettono di dividersi dopo un numero finito di volte in coltura, un processo chiamato senescenza cellulare replicativa. I fibroblasti umani, per esempio, tipicamente si dividono solo 25-40 volte in coltura prima di smettere. In queste cellule, la senescenza replicativa è causata da cambiamenti nella struttura dei telomeri, le sequenze ripetute di DNA alle estremità dei cromosomi. Quando una cellula si divide, le sequenze di DNA telomeriche non vengono replicate nello stesso modo come il resto del genoma, ma sono invece sintetizzate dall'enzima telomerasi. La telomerasi promuove anche la formazione di strutture proteiche che proteggono le estremità cromosomiche. Poiché i fibroblasti umani, e molte altre cellule somatiche umane, sono carenti dell'enzima telomerasi, i propri telomeri si accorciano a ogni divisione cellulare e la protezione proteica progressivamente si deteriora (figura 3.2). Alla fine, le estremità dei cromosomi esposte sono rilevate come danno del DNA e questo porta all'attivazione dell'arresto del ciclo cellulare. I fibroblasti umani possono essere forzati a proliferare indefinitamente fornendo loro il gene che codifica per la subunità catalitica della telomerasi: in questo caso, possono essere riprodotti come linea cellulare "immortalizzata" [9].



**Figura 3.2:** Accorciamento dei telomeri durante più cicli replicativi.

Alcune cellule umane, tuttavia, non possono essere immortalizzate tramite questo stesso metodo. Anche se i propri telomeri mantengono la lunghezza originaria, smettono ancora di dividersi dopo un numero limitato di cicli. Per immortalizzare queste cellule e rendere la linea cellulare continua, è necessaria una trasformazione oncogena, ovvero l'introduzione di alcuni oncogeni promotori del cancro, come quelli derivati da virus tumorali [9]. Linee cellulari continue possono essere più facilmente derivate direttamente da cellule tumorali, che sono cellule naturalmente immortalizzate. Questi due ultimi tipi sono dette linee cellulari trasformate. Sia le linee cellulari trasformate, sia quelle non trasformate, sono estremamente utili nella ricerca in campo cellulare come fonti di un gran numero di cellule di tipo uniforme, soprattutto perché possono essere conservate in azoto liquido a -196 °C per un periodo indefinito, conservando la loro vitalità quando scongelate (il congelamento in azoto liquido mantiene le cellule vive in completa quiescenza) [9]. La possibilità di produrre linee cellulari continue permette di ridurre la variabilità sperimentale legata all'utilizzo di colture primarie, garantendo maggiore riproducibilità. È importante tenere presente, tuttavia, che le cellule di entrambi i tipi di linea cellulare differiscono quasi sempre in modo significativo dalle proprie progenitrici normali nei tessuti da cui sono state derivate.

### 3.2.1 Esempi di linee cellulari

La prima linea cellulare umana è stata la linea delle cellule HeLa, ottenuta nel 1952 da un carcinoma della cervice uterina: la denominazione HeLa deriva dal nome e cognome della donna da cui è stato asportato il tumore, Henrietta Lacks. Questa linea cellulare si è dimostrata di valore incommensurabile per la ricerca sulle cellule umane e tuttora rappresenta uno dei modelli di cellula più usati in laboratorio.

Nel maggiorananza dei casi, le linee cellulari utilizzate sono indifferenziate, origi-

nate da cellule staminali embrionali (ES, *Embryonic Stem*). Queste si ricavano a partire da cellule estratte dalla massa cellulare interna della blastocisti (struttura che si forma durante la fase germinale, a pochi giorni dalla fecondazione) e messe in coltura a formare la linea cellulare. Queste cellule sono rilevanti perché possono proliferare indefinitamente in coltura e conservare un potenziale di sviluppo senza restrizioni [9]. Aggiungendo fattori di crescita diversi è possibile poi indurre un differenziamento delle cellule.

Alcuni esempi di linee cellulari più comunemente utilizzate negli esperimenti di elettrofisiologia sono riportati di seguito.

### 3.2.1.1 HEK 293

HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*) è una linea cellulare derivata da cellule renali embrionali umane in coltura tissutale. Questa linea particolare è stata originata dalla trasformazione e coltura di cellule HEK normali con DNA di adenovirus 5. La linea è stata coltivata dallo scienziato Alex Van der Eb, nei primi anni '70, presso il suo laboratorio all'università di Leiden, in Olanda. La trasformazione è stata eseguita da Frank Graham, un altro scienziato dello stesso laboratorio, che era solito numerare i suoi esperimenti: il nome HEK 293 deriva dal fatto che si trattava dell'esperimento numero 293 [42].

La fonte delle cellule è un sano feto abortito. Il tipo di cellule di rene da cui la linea deriva è invece sconosciuto ed è difficile da individuare con certezza dopo la trasformazione, poiché l'adenovirus potrebbe aver perturbato significativamente la morfologia cellulare e poiché il rene embrionale è una miscela eterogenea di più tipi cellulari (endoteliale, epiteliale, fibroblasti) presenti nel corpo umano. In realtà, è stato ipotizzato da ricercatori che le cellule potessero essere neuronali in origine, a causa della presenza di mRNA e prodotti genici tipicamente presenti nei neuroni.

### 3.2.1.2 COS-7

La linea cellulare COS-7 è stata derivata dal rene di scimmia verde africana, *Cercopithecus aethiops*. Le cellule stesse assomigliano molto ai fibroblasti nell'uomo e sono quindi spesso chiamate "*COS-7 monkey fibroblast*" o "*COS-7 fibroblast-like cells*". Le COS-7 non sono cellule primarie: negli anni '60 era stata originata la linea cellulare CV-1 dal rene di scimmia verde africana; nei primi anni '80, la linea COS-7 è stata sviluppata dalla CV-1, da parte di Yakov Gluzman, immortalizzandola tramite trasformazione con il virus SV40 [41]. La parola COS è un acronimo derivato dal fatto che le cellule sono CV-1 in Origine e trasportano il materiale genetico del virus SV40. Due forme di linee cellulari COS comunemente usate sono COS-1 e COS-7.

### 3.2.1.3 Ovociti di *Xenopus*

*Xenopus* (letteralmente "piede strano") è un genere di rana acquatica nativa dell'Africa meridionale. Queste rane sono molto tolleranti all'inedia e alle malattie permettendo al genere di estendersi su più di 45 gradi di latitudine nell'Africa sub-sahariana. Questa costituzione formidabile rende molto facile la loro crescita in cattività e, quindi, le rane *Xenopus* sono ampiamente utilizzate nel campo della ricerca. Le grandi dimensioni degli ovociti di *Xenopus* li hanno resi un importante strumento per studi di canali e trasportatori ionici [132].

### 3.2.1.4 tsA201

La linea cellulare tsA201 è derivata da cellule HEK 293 renali embrionali umane, mediante trasfezione stabile con il virus SV40. Queste cellule sono state scelte per la loro elevata efficienza di trasfezione [81]. La linea cellulare è infatti utilizzata in una varietà di saggi di espressione funzionale ed è stata riportata la propria capacità di produrre alti livelli di proteine ricombinanti.

### 3.2.1.5 MEF

Linee cellulari di fibroblasti embrionali di topo (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast*), derivate da embrioni di topo geneticamente manipolati, possono essere utilizzate come strumenti per la comprensione dei meccanismi molecolari delle funzioni delle proteine e dei segnali cellulari. Anche se la crescita di cellule MEF in cultura primaria può essere facilitata da mutazioni spontanee che aumentano la proliferazione cellulare e inibiscono l'apoptosi, i cambiamenti genetici possono interferire con l'interpretazione dei dati quando si confrontano MEF wild-type e mutanti creati in queste condizioni. Diversi metodi sono attualmente in uso per trasformare le cellule MEF primarie in linee cellulari immortalizzate: il più comune è la trasformazione virale con il virus di Epstein-Barr (EBV), virus SV40, adenovirus E1A e E1B, virus del papilloma umano (HPV) E6 ed E7 [51]. Per esempio, la linea cellulare MEF-1 è stata avviata nel 1993 tramite trasfezione di fibroblasti embrionali di topo con plasmidi codificanti il virus SV40.

### 3.2.2 Trasfezione genica

L'utilizzo delle linee cellulari trova applicazione negli studi di fenomeni biologici legati alla crescita, differenziamento e morte cellulare; in studi di genetica, della struttura e funzione dei geni; nello studio dei meccanismi molecolari/cellulari coinvolti nelle funzioni cellulari; come strumenti per la biologia molecolare (amplificazione genica, produzione/estrazione di proteine) o come strumenti per la terapia (terapia cellulare, cellule staminali, terapia genica, rigenerazione tissutale).

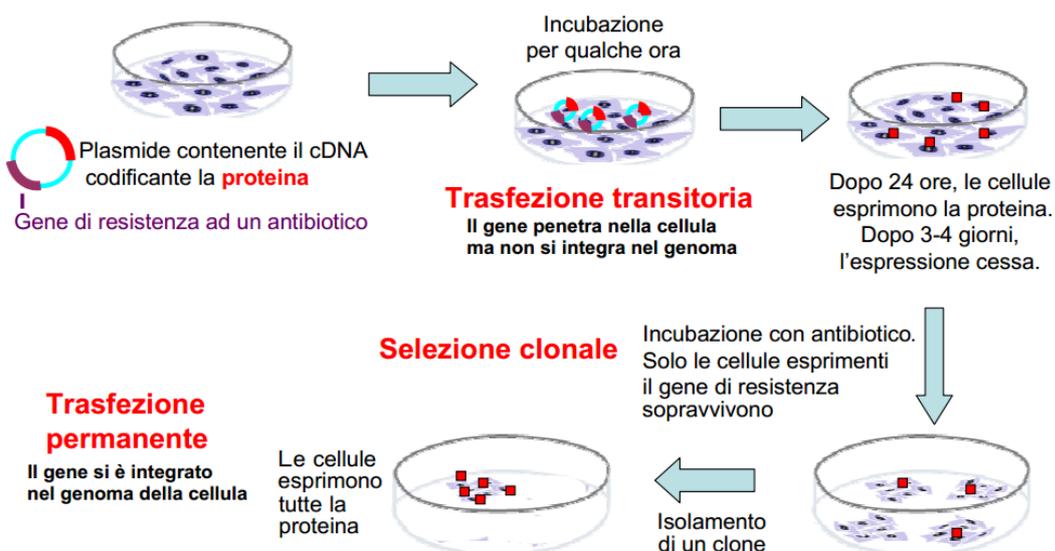
In tutti questi casi occorre manipolare le cellule per "pilotarle" verso la direzione desiderata, modificando il loro DNA. Questo si ottiene con la tecnica di trasfezione: essa permette l'introduzione di DNA esogeno nelle cellule in coltura, consen-

tendo di studiare la funzione ed i meccanismi di controllo dei geni. Per facilitare l'ingresso del DNA esogeno nelle cellule sono stati sviluppati diversi metodi, ciascuno più efficace a seconda delle linee cellulari utilizzate. Essenzialmente si può avere trasferimento diretto del DNA, per esempio, mediante microiniezione in vitro o bombardamento con microscopiche particelle metalliche rivestite di DNA in vivo; oppure trasfezione attraverso metodi fisici e chimici che fanno sì che le cellule internalizzino il DNA presente nel terreno di coltura.

La trasfezione può avvenire:

- tramite liposomi, il DNA viene veicolato in micelle (i liposomi) che si fondono alla membrana cellulare. Le ditte che producono i kit di trasfezione tramite liposomi forniscono un gran numero di miscele diverse di lipidi, la cui efficienza varia a seconda del particolare tipo cellulare.
- Tramite elettroporazione, l'applicazione di brevi impulsi ad alto voltaggio provoca la formazione di micropori nelle membrane cellulari. Il DNA, di per sé carico negativamente, entra nel citoplasma risentendo del campo elettrico generato e raggiunge il nucleo. I parametri dell'elettroporazione (intensità e durata dell'impulso) devono essere determinati empiricamente per ciascuna linea cellulare.
- Tramite calcio-fosfato, vengono mescolate due soluzioni a base di ioni fosfato e cloruro di calcio oltre al DNA da trasfettare. Si produce un precipitato di calcio-fosfato, che successivamente lega le molecole di DNA. Il precipitato viene estratto e aggiunto al terreno di coltura, dove penetra nel citoplasma delle cellule per endocitosi e poi è trasferito al nucleo.
- Il DNA può, infine, essere inserito tramite l'impiego di retrovirus il cui materiale genetico è stato modificato inserendo il gene da trasfettare.

La trasfezione può essere transiente oppure stabile. Nel primo caso le cellule transfettate non integrano il DNA esogeno nel proprio genoma, ma lo mantengono nel nucleo come elemento extracromosomico, il quale viene via via diluito e degradato. Si parla di trasfezione transiente quando le proprietà della cellula sono state modificate grazie all'introduzione del DNA, ma tale cambiamento è di breve durata (qualche giorno). In questi casi le cellule vengono, in genere, raccolte 24-48 ore dopo la trasfezione per valutare l'effetto prodotto dal gene transfettato (figura 3.3). Qualora il DNA esogeno, invece, si integri nel genoma della cellula e possa essere trasmesso ai discendenti, si parla di trasfezione stabile. Si mira ad isolare e propagare cloni che contengano il DNA transfettato: dopo la trasfezione le cellule vengono mantenute nel mezzo di coltura per 1-2 giorni, poi vengono poste in un mezzo selettivo (spesso contenente un antibiotico) in cui solo le cellule che hanno integrato il DNA esogeno riescono a sopravvivere (il DNA esogeno, oltre al gene di interesse, contiene un secondo gene che codifica per una resistenza all'antibiotico). Il mezzo selettivo viene poi usato per 2-3 settimane fino alla selezione delle singole colonie (figura 3.3).



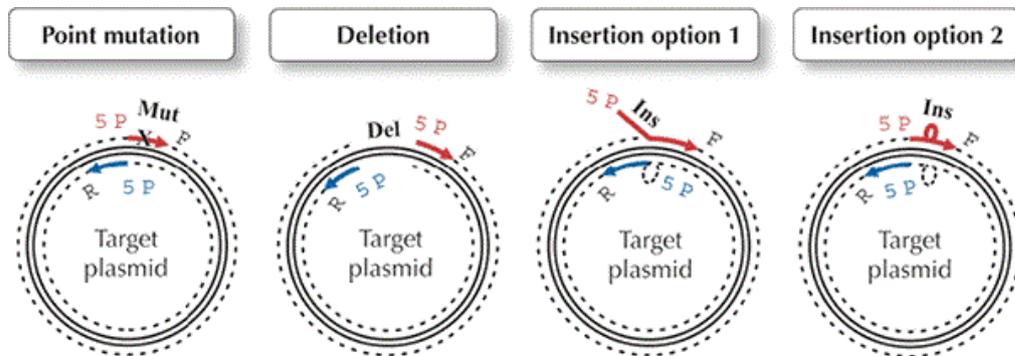
**Figura 3.3:** Trasfezione transiente e trasfezione stabile.

Le trasfezioni transienti sono adeguate per condurre un gran numero di esperimenti di breve durata, come ad esempio per determinare l'efficienza di un dato promotore. Le trasfezioni stabili, invece, sono necessarie per la conduzione di esperimenti analitici di lunga durata o qualora si volesse ottenere una linea cellulare in grado di produrre proteine ricombinanti da utilizzare per lunghi periodi.

### 3.2.3 Espressione eterologa di canali ionici e mutagenesi

L'espressione eterologa di proteine è un procedimento che permette di far esprimere, ad una linea cellulare, la proteina che si vuole studiare, attraverso il trasferimento del gene codificante la proteina avvenuto in seguito a trasfezione genica. Il plasmide contenente il cDNA codificante per la proteina viene trasfettato nelle cellule e, dopo l'incubazione, queste iniziano ad esprimere la proteina. Dopo 3-4 giorni l'espressione cessa se la trasfezione era transitoria, mentre continua nel caso di trasfezione permanente. Nel campo dell'elettrofisiologia, la proteina che viene fatta esprimere è un canale ionico: in tal modo si possono studiare canali ionici umani o animali, senza ricorrere a biopsie. Un ulteriore aspetto importante è la possibilità di analizzare e caratterizzare canali mutati fabbricati in vitro mediante una tecnica chiamata mutagenesi, una volta nota la mutazione che ha alterato la sequenza nucleotidica del gene codificante per il canale.

La mutagenesi è una tecnica di biologia molecolare tramite cui si induce una mutazione in una molecola di DNA. A differenza della tecnica standard, in cui vengono indotte mutazioni che si distribuiscono in modo casuale nella sequenze di DNA, la mutagenesi sito-specifica, o sito-diretta, permette di creare la mutazione in modo selettivo in un particolare sito della molecola di DNA. La mutazione inserita potrà essere una sostituzione di base, una inserzione o una delezione di un nucleotide (o più nucleotidi) rispetto alla sequenza originaria, di tipo selvatico o, meglio, wild-type (figura 3.4).



**Figura 3.4:** Esempi di plasmidi utilizzati nella mutagenesi sito-specifica.

La principale tecnica di mutagenesi sito-diretta utilizza l'impianto sperimentale della PCR<sup>1</sup>: la procedura di base richiede la conoscenza della sequenza wild-type del gene da mutagenizzare (sotto forma di plasmide) e la sintesi di un breve oligonucleotide che funge da primer. Il primer sintetico contiene la mutazione desiderata ed è complementare al DNA stampo attorno al sito di mutazione in modo che possa ibridarsi con il DNA nel gene di interesse (l'oligonucleotide deve essere lungo abbastanza da permettere l'ibridazione anche se la complementarità non è assoluta). Il primer viene poi esteso utilizzando una DNA polimerasi che copia il resto del gene template. Al termine del primo ciclo di PCR quindi si avranno plasmidi formati da un filamento con la mutazione (quello contenente il primer) e il filamento originario, con sequenza wild type. Dopo più cicli si otterrà un elevatissimo numero di plasmidi con soli filamenti mutati.

<sup>1</sup>Reazione a catena della polimerasi (in inglese *Polymerase Chain Reaction*): tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro, molto rapidamente, alte quantità di materiale genetico necessarie per le successive applicazioni.

### 3.3 Principali mutazioni legate ad aritmie cardiache

Le mutazioni geniche sono implicate in maniera sempre più crescente nella patogenesi delle malattie del cuore umano. I progressi nelle tecnologie di sequenziamento e le riduzioni dei costi stanno rapidamente portando l'analisi della sequenza del genoma umano nell'ambito clinico. La principale sfida che ora si pone di fronte ai ricercatori ed ai clinici allo stesso modo, è l'interpretazione del significato funzionale del gran numero di nuove varianti geniche non classificate ed identificate come mutazioni candidate responsabili delle malattie. Fattori come la co-segregazione, nelle famiglie, di varianti con stato affetto e l'assenza delle stesse varianti in popolazioni di controllo, sono stati utilizzati per fornire prove di sostegno alla patogenicità. Tuttavia, la dimostrazione degli effetti funzionali rilevanti è, in ultima analisi, necessaria per confermare che una specifica variante sia causa della malattia [53].

La valutazione funzionale delle mutazioni candidate ad essere causa di aritmie cardiache viene tradizionalmente condotta tramite sistemi di espressione in vitro che coinvolgono misure di patch- o voltage-clamp su cellule provenienti da linee cellulari continue. Tuttavia, questi metodi in vitro non possono tenere conto dell'influenza di modificatori genetici e vari fattori ambientali che influenzano la funzione cardiaca in vivo, compresi i fattori neuroumorali, lo stiramento meccanico ed il carico emodinamico [53].

Ad oggi, è documentato che le mutazioni nei geni che codificano per i canali ionici cardiaci o loro subunità causano una varietà di aritmie, incluse la sindrome del QT lungo (LQTS), sindrome del QT corto (SQTS), sindrome di Brugada (BrS) e disturbi della conduzione. Mentre alcune delle forme ereditarie di aritmie, come la LQTS, sono abbastanza ben approfondite e comprese, poco si sa sui difetti dei geni coinvolti nelle forme ereditarie di bradicardia e disfunzione del nodo del seno, come la sindrome del nodo malato [88]. I pazienti con questa sindrome

soffrono di bradicardia, blocco seno-atriale o arresto sinusale, con episodi di tachicardia atriale. Per esempio, mutazioni nei geni del canale del sodio SCN5A e del canale pacemaker HCN4 sono state riportate come causa della sindrome del nodo malato [88].

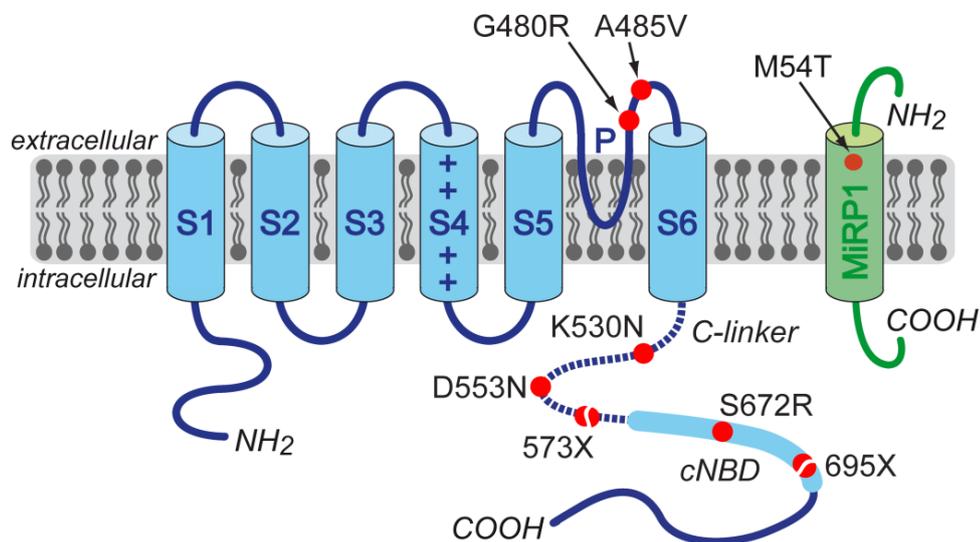
Di seguito si vedranno nello specifico alcune delle più frequenti mutazioni associate ad aritmie cardiache, come queste influiscono sulla normale attività elettrica delle cellule ed, in particolare, l'impatto che esse hanno sulla funzione macroscopica del tessuto specializzato del nodo senoatriale, in quanto il principale termine di confronto con la clinica, in questi casi, è il valore della frequenza cardiaca.

### 3.3.1 Mutazioni del canale funny

La caratterizzazione molecolare ha dimostrato che la corrente funny  $I_f$  viene trasportata attraverso i canali ionici *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated* (HCN). La famiglia dei canali HCN si compone di quattro isoforme, da HCN1 a HCN4 [127]. Tutte e quattro le isoforme HCN sono state trovate nei cuori dei vertebrati, ma l'espressione di ciascuna di esse varia a seconda del tessuto cardiaco, della specie, dell'età e dello stato fisio-patologico. Il SAN contiene la parte più cospicua del messaggio totale di HCN del cuore e qui, nella maggior parte delle specie ad eccezione del ratto (in cui HCN2 è più espresso di HCN4), il trascritto di HCN dominante è l'HCN4, pari circa all'80% del messaggio totale. Il restante trascritto è principalmente HCN2 o HCN1 (HCN3 ha una bassissima espressione) [127].

La figura 3.5 mostra la topologia schematica della subunità HCN4. La subunità HCN4 è composta da sei segmenti transmembrana (S1-S6), con un dominio S4 recante un'elevata carica positiva che è considerato come il sensore di voltaggio, e il dominio P, tra S5 e S6, che forma il poro conduttore nonché il filtro di selettività. Le subunità HCN hanno le estremità N-terminale e C-terminale sul lato

intracellulare e la seconda è costituita da un *C-linker* (figura 3.5, linea tratteggiata) e un dominio di legame per i nucleotidi ciclici (cNBD, textslCyclic Nucleotide-Binding Domain). Al cNBD si lega l'denosina monofosfato ciclico (cAMP), il cui livello, nelle cellule SAN, è conseguente alla regolazione autonoma tramite il rilascio di noradrenalina o acetilcolina che, rispettivamente, alzano o abbassano il livello di cAMP legandosi ai recettori  $\beta$ -adrenergici o muscarinici e attivando o inibendo l'attività dell'adenilato ciclastasi [127].



**Figura 3.5:** Topologia schematica delle proteine HCN4 e MiRP1. I punti rossi indicano la posizione degli otto siti delle mutazioni di HCN4 e MiRP1 associate a bradicardia sinusale. I punti rossi divisi indicano i troncamenti risultanti dalle mutazioni non-senso 573X e 695X.

Il canale funny è composto da quattro subunità HCN (di varie isoforme) che formano un tetramero intorno ad un poro centrale. Inoltre, è stato dimostrato che i membri della famiglia delle singole proteine transmembrana MinK (*Minimal Potassium Subunits*), codificate dalla famiglia di geni KCNE, possono agire come subunità  $\beta$  per la famiglia di subunità  $\alpha$  HCN. In particolare MiRP1 (*MinK-Related Peptide 1*), codificato dal gene KCNE2, può associarsi con HCN1, HCN2

e HCN4 e modulare l'espressione e la cinetica dei canali HCN [127].

Ad oggi, sette mutazioni nella subunità  $\alpha$  HCN4 ed una mutazione nella subunità  $\beta$  MiRP1 sono state associate alla sindrome del nodo malato [36, 63, 80, 87, 93, 107, 108, 120]. La sindrome del nodo malato (SSS, *Sick Sinus Syndrome*) comprende varie forme di aritmia che derivano dalla disfunzione del nodo senoatriale: bradicardia sinusale inappropriata, arresto sinusale o incompetenza cronotropica [17], oltre che blocco di uscita seno-atriale (in cui il potenziale d'azione che si genera nel nodo del seno non può uscire dal nodo verso gli atri) e combinazioni di disturbi di conduzione senoatriale e atrioventricolare; queste bradiaritmie spesso si verificano in concomitanza con tachiaritmie atriali parossistiche [112]. La bradicardia sinusale (SB, *Sinus Bradycardia*) è convenzionalmente definita come una frequenza cardiaca basale inferiore a 60 battiti al minuto (bpm). Se asintomatica è solitamente innocua ed è spesso segno di buona condizione fisica. D'altra parte, se sintomatica, come la bradicardia associata alla sindrome del nodo malato, può essere una condizione pericolosa per la vita e richiede attenzione medica. Il fatto che la bradicardia sinusale possa essere ereditata indica che può avere una base genetica [80].

La figura 3.5 indica la posizione di ciascuna delle mutazioni che colpiscono le subunità proteiche HCN4 e MiRP1 e, di seguito, saranno descritte nel dettaglio.

### 3.3.1.1 G480R

Nof et al. [93] hanno studiato sette membri di una famiglia affetti da bradicardia sinusale, con frequenza cardiaca media di  $48 \pm 12$  bpm, ovvero  $-34.2\%$  di quella dei non affetti ( $73 \pm 11$  bpm). Attraverso lo screening del gene HCN4, essi hanno scoperto una mutazione puntiforme missenso (transversione da guanina a citosina) in posizione 1439 nel quarto esone del gene, risultante nella sostituzione dell'amminoacido glicina (G) con arginina (R) in posizione 480 della sequenza

polipeptidica (da cui il nome G480R).

Dalla caratterizzazione elettrofisiologica dei canali mutati espressi, in omozigosi, in ovociti di *Xenopus* e in cellule HEK 293, è risultato uno shift di circa -30 mV (verso potenziali negativi) della curva I-V della corrente  $I_f$  ([93], figure 5B e 6B), accompagnata da una riduzione dell'88% della densità di corrente misurata a -100 mV ([93], figura 6C). Espressi in eterozigosi, i canali mutati sono caratterizzati da alterazioni intermedie tra la condizione wild-type e di mutazione omozigotica (shift di circa -15 mV della curva I-V e riduzione di circa il 50% della densità di corrente). In entrambi i casi di espressione, si nota un rallentamento dell'attivazione della corrente. Gli effetti della mutazione sono riassunti in tabella 3.1.

### 3.3.1.2 A485V

Oggetto di studio del lavoro di Laish-Farkash et al. [63] è la mutazione missenso A485V del gene HCN4 riscontrata nei membri di una famiglia marocchina. La frequenza cardiaca media dei portatori della mutazione è  $58 \pm 6$  bpm contro  $77 \pm 12$  bpm dei non portatori (quindi -24.7%). La mutazione provoca una transizione da citosina a timina nell'esone 4, in posizione 1454 della sequenza nucleotidica, che risulta nella sostituzione dell'amminoacido alanina con valina in posizione 485 della proteina.

La caratterizzazione è stata effettuata esprimendo i canali mutati in maniera omo-merica ed eterometrica, sia in ovociti di *Xenopus*, sia in cellule HEK 293. La curva I-V della corrente generata è shiftata di circa 55 mV e 15 mV a sinistra rispettivamente nei casi di omozigosi ed eterozigosi ([63], figura 3C). La densità di corrente misurata a -120 mV è ridotta al 2.5% e al 33.6%, rispetto alla situazione wild-type, nei casi omozigote ed eterozigote rispettivamente ([63], figure 3C e 4). In entrambe le condizioni è evidenziata una cinetica di attivazione rallentata. Si

veda la tabella 3.1 per il riepilogo degli effetti della mutazione.

### 3.3.1.3 K530N

Quella riscontrata da Duhme et al. [36] in pazienti soggetti a fibrillazione atriale e bradicardia sinusale (50-60 bpm) è una mutazione missenso del gene HCN4 in cui la guanina in posizione 1590 viene sostituita con una citosina determinando, nella sequenza peptidica, la sostituzione di lisina con asparagina in posizione 530 (K530N).

Espressi in cellule HEK 293, i canali mutati omometrici non riportano significative differenze rispetto ai canali wild-type per quanto riguarda i parametri che descrivono la cinetica di attivazione e deattivazione ([36], figure 3B, 3E, 4C). Al contrario, nel caso eterometrico, Duhme et al. registrano uno shift negativo della curva steady-state di (de)attivazione di 14.2 mV ([36], figura 3C), senza variazione significativa della pendenza; e un rallentamento della fase di attivazione, ma non di quella di deattivazione ([36], figure 3F, 4D). Gli effetti della mutazione sono riassunti in tabella 3.1.

### 3.3.1.4 S672R

La mutazione missenso S672R consiste nella transversione da citosina a guanina alla posizione 2016 del gene HCN4, che risulta nella sostituzione dell'amminoacido serina con arginina in posizione 672 della proteina finale.

La mutazione è stata studiata da Milanese et al. [80] e riscontrata in pazienti bradicardiaci con frequenza cardiaca media di  $52.2 \pm 1.4$  bpm, ovvero -28.7% di quella dei non portatori della mutazione ( $73.2 \pm 1.6$  bpm).

I canali mutati sono stati espressi in cellule HEK 293, sia in omozigosi, sia in eterozigosi. Nel primo caso sono stati registrati uno shift negativo, pari a -8.4 mV, della curva steady-state ed una riduzione della costante di tempo di deattivazione;

mentre non sono variati in modo significativo lo slope factor e la costante di tempo di attivazione ([80], figura 3A). Gli effetti sono analoghi nel caso eterozigote, con in particolare uno shift di -4.9 mV nella curva steady-state ([80], figura 3C).

Anche Xu et al. [140] hanno analizzato la mutazione S672R, tramite espressione eterozigote dei canali mutati e wild-type in ovociti di *Xenopus*. In accordo con Milanesi et al., essi riportano uno shift della curva di (de)attivazione di -6.1 mV ed una velocizzazione della fase di deattivazione; in aggiunta registrano un rallentamento della fase di attivazione ([140] figure 2C-F). Xu et al. hanno inoltre ottenuto risultati simili facendo esprimere i canali mutati insieme a canali HCN2 wild-type: in questo caso lo shift della curva di (de)attivazione è di circa -9.9 mV ([140] figure 2E-F). I dati [80] e [140] sono riepilogati in tabella 3.1.

### 3.3.1.5 573X

Schulze-Bahr et al. [107] hanno effettuato uno studio su una famiglia affetta da diverse disfunzioni del nodo senoatriale, tra cui bradicardia sinusale (41 bpm). Tramite screenig del gene HCN4 nei pazienti, è stata riscontrata una delezione della citosina in posizione 1631 nell'esone 5. Tale mutazione dà origine ad un sito di restrizione, per cui la sequenza viene interrotta e causa l'eliminazione del tratto codificante per il dominio cNBD. La proteina risultante ha lunghezza di 572 amminoacidi (da cui il nome 573X).

I canali mutati sono stati espressi in cellule COS-7 sia in omozigosi, sia in eterozigosi. Nel primo caso non vi è shift significativo della curva di (de)attivazione, ma lo slope factor varia di -20.9% rispetto alla situazione wild-type ([107], figure 4B, 4D e tabella 3) e inoltre la costante di tempo della fase di attivazione si riduce, ma non significativamente. Anche nel secondo caso la costante di tempo della fase di attivazione si riduce in modo non significativo, ma la curva steady-state è shiftata verso potenziali positivi di 4.6 mV e lo slope factor varia di -12.1% ([107], figure

5B, 5D e tabella 3). In tabella 3.2 sono riepilogati gli effetti della mutazione.

#### **3.3.1.6 695X**

Nel lavoro svolto da Schweizer et al. [108] è stata oggetto di analisi una famiglia composta da 14 membri, 8 dei quali erano portatori della mutazione 695X nel gene HCN4. Questi presentavano una marcata bradicardia sinusale a  $56.4 \pm 4.8$  bpm, rispetto ai  $71.6 \pm 10.3$  bpm della frequenza cardiaca media dei non portatori (-21.2%). La mutazione consiste nell'inserzione di 13 nucleotidi in posizione 1933 nell'esone 6 del gene, che genera un frameshift ed induce un prematuro codone di stop, portando al troncamento del dominio cNBD.

Le misurazioni effettuate su cellule HEK 293 trasfettate con HCN4 wild-type e mutato, a formare canali omomerici o eteromerici, hanno portato Schweizer et al. a concludere che i canali omomerici hanno curva di (de)attivazione shiftata a destra, ma non in modo significativo, mentre hanno una variazione significativa della pendenza (-25% dello slope factor) e della costante di tempo della fase di attivazione che risulta più veloce ([108], figura 5 e tabella 2). Nei canali eteromerici non risultano significative alterazioni ([108], figura 7 e tabella 2). Per un riepilogo degli effetti della mutazione si veda la tabella 3.2.

#### **3.3.1.7 D553N**

La mutazione D553N è una mutazione missenso dovuta alla transizione da guanina ad adenina nell'esone 5 del gene HCN4, risultante nella sostituzione, al codone 553, dell'amminoacido aspartato con asparagina.

La mutazione è stata studiata da Ueda et al. [120] e riscontrata in una paziente bradicardica (frequenza cardiaca media 39 bpm). La caratterizzazione elettrofisiologica ha rilevato che i canali mutati, espressi sia in omozigosi sia in eterozigosi, non mostrano variazioni nella curva steady-state di (de)attivazione, ma si attivano

più velocemente e si deattivano più lentamente dei canali wild-type ([120], figure 4C, 4E e tabella 1). La densità di corrente registrata a -120 mV risulta, invece, ridotta circa del 92% e del 63% nei casi omozigote ed eterozigote rispettivamente ([120], figura 4B).

La stessa mutazione è stata analizzata anche da Netter et al. [88] attraverso l'espressione omologa ed eterologa in ovociti di *Xenopus*. Essi non riportano alcun cambiamento significativo nei parametri della curva di (de)attivazione, né nella cinetica ([88], figure 3F, 3H-I) per il caso di omozigosi e, allo stesso modo, nemmeno per quello di eterozigosi. La densità di corrente a -130 mV, attraverso i canali mutati omomerici, è notevolmente ridotta (-88% circa), ma non lo è nel caso dei canali eterometrici ([88], figura 3C). Al contrario, la corrente è ridotta di circa l'85% nel caso di espressione eterologa di HCN4 mutato e HCN2 wild-type ([88], figura 3E). I dati [120] e [88] sono riepilogati in tabella 3.2.

### 3.3.1.8 M54T

Nawathe et al. [87] hanno recentemente riportato un caso di mutazione missenso nella proteina MiRP1, che funge da subunità  $\beta$  per il canale HCN, riscontrata in un paziente affetto da sindrome del QT lungo e da bradicardia (39-56 bpm). La mutazione rimpiazza la timina in posizione 161 della sequenza del gene *KCNE2* con una citosina, determinando la sostituzione, in posizione 54, dell'amminoacido metionina con treonina (M54T).

Nawathe et al. hanno effettuato espressioni omologhe di HCN4 o HCN2 insieme a MiRP1 wild-type o mutato. I risultati mostrano variazioni non significative dei parametri che descrivono la curva di (de)attivazione sia nel caso HCN4, sia HCN2 ed un rallentamento della fase di attivazione in entrambi ([87], figure 2D, 3C). Inoltre, essi mostrano una netta riduzione della densità di corrente a -110 mV, pari all'82.4% del caso wild-type per quanto riguarda l'espressione omolo-

ga di HCN4, ma nessuna riduzione significativa nell'espressione di HCN2 ([87], figure 2C, 3A). Tali effetti sono riassunti in tabella 3.2.

### 3.3.1.9 Discussione

Le mutazioni sopra descritte dei geni HCN4 e KCNE2, che influiscono sulla "corrente pacemaker"  $I_f$  (tabelle 3.1 e 3.2), sono state riscontrate in pazienti con disfunzioni del nodo del seno e, tutte, causano una perdita di funzionalità del canale risultante (mutazioni di tipo loss of function). In alcune mutazioni si osserva una significativa riduzione dell'espressione del canale mutato, rispetto alla situazione wild-type [63, 120]. Fenomeni quali l'alterazione nella sintesi, processamento e trafficking dei canali probabilmente spiegano la radicale riduzione di ampiezza della corrente.

Mutazione		G480R		A485V		K530N		S672R			
Tipo di espressione		om.	et.	om.	et.	om.	et.	om.	et.	et.	et.*
(de)attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	~-30	~-15	~-55	~-15	n. s.	-14.2	-8.4	-4.9	-6.1	~-9.9
	slope (%)	-	-	-	-	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	-	-
	$\tau_{act}$	>	>	>	>	n. s.	>	n. s.	n. s.	>	>
	$\tau_{deact}$	-	-	-	-	n. s.	n. s.	<	<	<	<
Densità di corrente (%)		-88	~-50	-97.5	~-66.4	-	-	-	-	-	-
Patologia		SB		SB		SB, AF		SB		SB	
Riferimento		[93]		[63]		[36]		[80]		[140]	

**Tabella 3.1:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente funny. Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *AF*, Atrial Fibrillation; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di HCN2 wild-type; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura); >, variazione in aumento, <, variazione in diminuzione.

In altri casi, una cinetica rallentata e un intervallo di attivazione della corrente spostato verso potenziali più negativi concorrono ad un minor apporto del canale mutato alla corrente  $I_f$  [63, 80, 93]. In altri casi ancora, una più rapida chiusura (deattivazione) dei canali di  $I_f$  durante il potenziale d'azione può diminuire la disponibilità di corrente, rallentando così la frequenza cardiaca [107].

Mutazione		573X		695X		D553N					M54T**	
Tipo di espressione		om.	et.	om.	et.	om.	et.	om.	et.	et.*	om.	om.*
(de)attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	n. s.	+4.6	n. s.	n. s.							
	slope (%)	-20.9	-12.1	-25	n. s.	n. s.						
	$\tau_{act}$	<	<	<	n. s.	<	<	n. s.	n. s.	n. s.	>	>
	$\tau_{deact}$	-	-	-	-	>	>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	-
Densità di corrente (%)		-	-	-	-	~-92	~-63	~-88	n. s.	~-85	-82.4	n. s.
Patologia		SB		SB		SB		SB			SB, LQT	
Riferimento		[107]		[108]		[120]		[88]			[87]	

**Tabella 3.2:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente funny e del dominio di membrana MiRP1. Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT; \*\*, mutazione di MiRP1; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di HCN2 wild-type; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura); >, variazione in aumento, <, variazione in diminuzione.

Tutte queste alterate proprietà di (de)attivazione influiscono sull'automaticità e causano disfunzioni del SAN: esse portano ad un ridotto flusso di corrente entrante durante la fase di depolarizzazione diastolica e, quindi, al rallentamento della frequenza cardiaca. La bassa frequenza favorisce, inoltre, l'insorgenza di attività ectopica che può innescare la fibrillazione atriale che, a sua volta, può potenziare la disfunzione del SAN mediante down-regolazione di  $I_f$  [36]. Infine, le mutazioni che provocano l'eliminazione del dominio cNBD nella sequenza della subunità

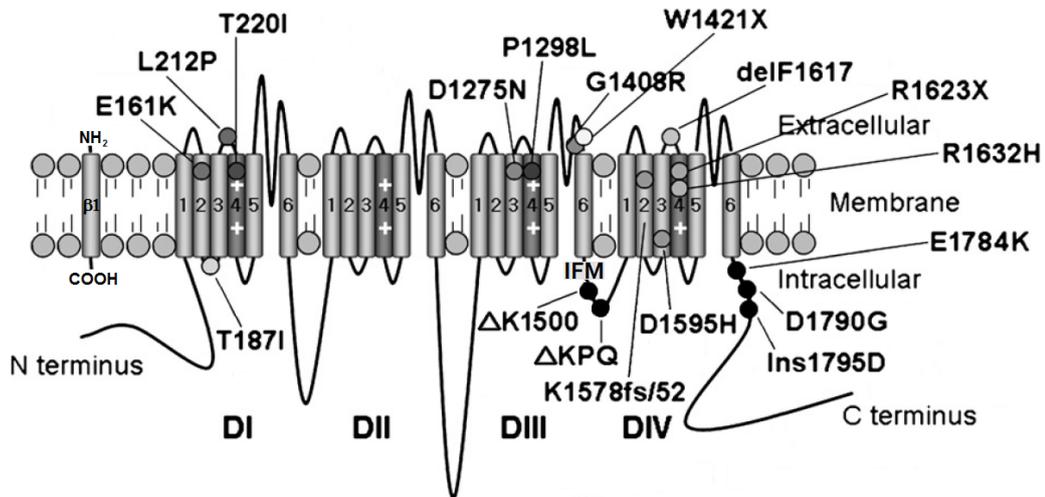
HCN4 derivata, a causa di un troncamento dell'estremità C-terminale, danno origine a canali insensibili all'aumento nella concentrazione di cAMP intracellulare durante la stimolazione  $\beta$ -adrenergica e questo spiega l'incompetenza cronotropica osservata nei pazienti durante l'esercizio fisico [107].

I risultati descritti, valutati negli esperimenti di voltage-clamp su canali mutanti omomerici ed eteromerici, in vari sistemi di espressione mammiferi e non, sottolineano l'importante ruolo modulatore di  $I_f$  nel determinare la frequenza cardiaca nell'uomo. Tuttavia, gli effetti funzionali indotti dalle mutazioni non sembrano sempre pienamente compatibili con le caratteristiche clinicamente osservate: per esempio, anche la mutazione 695X [108], così come la 573X [107], determina il troncamento del dominio cNBD nella subunità HCN4 e l'insensibilità dei canali mutati all'aumento di cAMP, ma, in questo caso, i pazienti mostrano una regolare competenza cronotropica (la frequenza cardiaca massima dei portatori della mutazione non è significativamente diversa da quella dei non portatori) [108]. Va considerato il fatto che le condizioni degli esperimenti in vitro differiscono da quelle fisiologiche in vivo e, in alcuni casi, i dati mostrati sono incompleti, oppure presentano differenze apparentemente piuttosto essenziali laddove più gruppi di ricercatori hanno valutato una particolare mutazione (per esempio, la notevole riduzione della corrente  $I_f$  dovuta alla mutazione D553N è causata, secondo Ueda et al., da problemi di espressione e trafficking dei canali [120], cosa non riscontrata da Netter et al. i quali, al contrario, spiegano la riduzione di corrente come un'aumentata stabilità del canale in una configurazione che ne riduce la normale attività, dovuta alla variazione della carica posseduta dal nuovo amminoacido che si sostituisce a quello originale nella mutazione [88]). Un ulteriore punto che richiede attenzione è la comune identificazione dei canali funny con i canali HCN4: anche se molto abbondante, non è l'unica isoforma presente nel SAN umano ed è escluso un co-assemblaggio preferenziale di sole subunità HCN4 nei tetrameri

che formano i canali di  $I_f$ . Questo può non essere significativo per quanto riguarda il comportamento del canale wild-type, ma può esserlo nel caso di interazione con subunità mutate.

### 3.3.2 Mutazioni del canale del sodio

Il canale cardiaco voltaggio-dipendente del sodio è costituito da una subunità  $\alpha$  proteica transmembrana associata ad una piccola subunità  $\beta$  accessoria modulatrice e diverse altre proteine regolatrici. La subunità  $\alpha$   $Na_v1.5$  (codificata dal gene SCN5A) ha estremità N- e C-terminali citoplasmatiche ed è costituita da quattro domini omologhi (DI-DIV) interconnessi da linker citoplasmatici (figura 3.6).



**Figura 3.6:** Topologia schematica del canale  $Na_v1.5$  codificato dal gene SCN5A. I punti grigi, neri e bianchi indicano la posizione dei siti delle mutazioni di SCN5A associate a bradicardia sinusale e sindrome del nodo malato.

Ciascun dominio comprende sei segmenti transmembrana (S1-S6) che, a loro volta, sono interconnessi da anse extracellulari e citoplasmatiche. I quattro domini si ripiegano a formare un poro conduttivo, che è rivestito dalle anse extracellulari (anse P) tra i segmenti S5 e S6: le anse P sono considerate il filtro di selettività

del canale. Il segmento S4, altamente carico, funge da sensore di voltaggio ed è responsabile dell'attivazione del canale durante la depolarizzazione della membrana. L'inattivazione rapida della corrente coinvolge un gate formato da un gruppo di tre amminoacidi idrofobici (motivo IFM, figura 3.6) nel linker intracellulare DIII-DIV, insieme a due siti di ancoraggio situati sui linker intracellulari tra S4 e S5 dei domini DIII e DIV. Inoltre, il dominio carbossi-terminale (COOH-) è anch'esso coinvolto nello stabilizzare la chiusura del gate. L'inattivazione lenta comporta variazioni conformazionali nelle anse P e coinvolge anche il linker S4-S5 in DIII. La subunità  $\beta$  ( $\beta$ 1-4, codificate dai geni SCN1B-SCN4B) si lega alle anse extracellulari tra i segmenti S5 e S6, permettendo loro di modulare densità e cinetica del canale [103].

Negli ultimi due decenni, un crescente numero di mutazioni del gene SCN5A è stato descritto in pazienti con sindrome del QT lungo di tipo 3 (LQT3), sindrome del nodo malato, difetti di conduzione, sindrome di Brugada (BrS, *Brugada Syndrome*), paralisi atriale (AS, *Atrial Standstill*), fibrillazione atriale (AF, *Atrial Fibrillation*), cardiomiopatia dilatativa (DCM, *Dilated CardioMyopathy*) e sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome*) [103]. Studi genetici, elettrofisiologici e molecolari combinati hanno fornito informazioni sulla (dis)funzione e (dis)regolazione del canale cardiaco del sodio nel contesto delle mutazioni identificate in pazienti affetti da queste sindromi aritmiche ereditarie. Tra le malattie elencate, ve ne sono alcune legate all'attività del nodo senoatriale. Per esempio, oltre al caratteristico prolungamento dell'intervallo QT, bradicardia e pause sinusali sono state associate al fenotipo LQT3: poiché il prolungamento dell'intervallo QT è maggiormente pronunciato alle frequenze cardiache più basse, mentre è praticamente assente a frequenze elevate, la bradicardia rappresenta un importante fattore indiretto nella predisposizione alle aritmie letali nei soggetti affetti da LQT3 [124]. La sindrome del nodo malato è

contraddistinta da bradicardia sinusale inappropriata, arresto sinusale o incompetenza cronotropica [68], mentre la paralisi atriale è un'aritmia estremamente rara, caratterizzata dall'assenza di attività elettrica e meccanica negli atri. Dal punto di vista elettrocardiografico, l'AS mostra bradicardia, assenza di onde P ed un complesso ritmo giunzionale di scappamento [46]. I difetti di conduzione si osservano, sull'ECG, in un allargamento del complesso QRS, indicativo di ritardi nell'eccitazione ventricolare: essi sono associati a bradicardia e possono manifestarsi sotto forma di sincope [103]. Si può quindi concludere che un ampio numero di mutazioni identificate nel gene SCN5A sia associato a disfunzioni del nodo senoatriale [68, 124]: la figura 3.6 indica la posizione di ciascuna di esse.

### 3.3.2.1 $\Delta$ KPQ, insD1795-1796, $\Delta$ K1500, D1790G, E1784K

Veldkamp et al. [124] hanno riportato una serie di mutazioni del gene SCN5A del canale del sodio associate a bradicardia sinusale in LQT3. La mutazione  $\Delta$ KPQ consiste nella delezione di nove paia di basi della sequenza nucleotidica, determinante la delezione degli amminoacidi 1505-1507, ovvero lisina, prolina e glutammina. L'inserzione di tre nucleotidi, timina-guanina-adenina, alla posizione 5537 provoca l'inserimento dell'acido aspartico tra i codoni 1795 e 1796 (insD1795-1796). L'eliminazione dell'amminoacido lisina al codone 1500, nella regione del linker tra terzo e quarto dominio della subunità  $\alpha$  del canale  $Na_v1.5$  (non è riportata la causa), determina la mutazione  $\Delta$ K1500. La transizione adenina→guanina al nucleotide 5519 provoca la sostituzione di acido aspartico in glicina al codone 1790 (D1790G). Infine la transizione dalla guanina 5350 ad adenina causa la sostituzione acido glutammico→lisina al codone 1784 (E1784K). Nei pazienti portatori di queste mutazioni, gli autori riportano variazioni della frequenza cardiaca intorno a -17% ( $\Delta$ KPQ), -9% (insD1795-1796), -19% ( $\Delta$ K1500) e -9% (D1790G). Il dato della mutazione insD1795-1796 è confermato da Bezzi-

na et al. [18], i quali riportano una riduzione del 9.4% della frequenza cardiaca (+10.4% CL). La mutazione E1784K è riscontrata in pazienti bradicardici da Wei et al. [137] (minima frequenza misurata 32 bpm) e da Deschênes et al. [29] (42 bpm). Il principale effetto di queste mutazioni è quello di determinare una non completa inattivazione dei canali che porta ad una corrente persistente. Tutti gli effetti sono riassunti nelle tabelle 3.3, 3.4 e 3.5.

### 3.3.2.2 E161K

La mutazione missenso E161K è stata riscontrata da Smits et al. [112] in pazienti affetti da varie patologie, tra cui bradicardia sinusale, sindrome del nodo malato e sindrome di Brugada. È stata riportata una riduzione della frequenza cardiaca minima (da  $51 \pm 0.6$  a  $39 \pm 1$  bpm) corrispondente ad un aumento del 30.8% del cycle-length, mentre non risulta alterata la massima frequenza. La mutazione consiste nella sostituzione dell'acido glutammico al codone 161 con l'amminoacido lisina, dovuta alla transizione guanina→adenina al nucleotide 481. Dalle registrazioni su cellule tsA201 trasfettate, gli autori hanno verificato alterazioni nell'attivazione del canale  $Na_v1.5$  e registrato una ridotta densità di corrente associata (tabella 3.4).

### 3.3.2.3 D1275N

Groenewegen et al. [46] hanno studiato la mutazione missenso D1275N in soggetti bradicardici e con paralisi atriale. Tale mutazione colpisce la guanina 3823 del gene SCN5A, variandola in adenina e provocando la sostituzione acido aspartico→asparagina al codone 1275. La caratterizzazione elettrofisiologica è stata eseguita in ovociti di *Xenopus* ed è emerso che l'espressione della sola subunità  $\alpha$  permette di osservare variazioni significative nella cinetica di attivazione del canale (tabella 3.4).

#### 3.3.2.4 G1408R, R1623X, T187I, K1578fs/52 e W1421X

La transizione da guanina ad adenina al nucleotide 4222 del gene SCN5A causa la sostituzione dell'amminoacido glicina in arginina al codone 1408 (G1408R); la variazione citosina→timina al nucleotide 4867 determina un sito di restrizione che interrompe la sequenza in corrispondenza dell'arginina al codone 1623 (R1623X); la transizione dalla citosina 559 a timina è responsabile della sostituzione al codone 187 di treonina in isoleucina (T187I); l'inserzione di due adenine in posizione 4729 della catena nucleotidica, corrispondente all'amminoacido lisina al codone 1578, provoca una mutazione frameshift che risulta in una proteina troncata al 52esimo codone (K1578fs/52); la transizione guanina→adenina al nucleotide 4262 causa il troncamento della proteina in corrispondenza del triptofano al codone 1421 (W1421X). Tutte queste mutazioni (tra le quali ve ne sono di missenso, non-senso e frameshift) hanno in comune il fatto di rendere del tutto non funzionale la proteina canale che ne deriva, attraverso la quale la corrente misurata è nulla [17, 62, 75, 91]. Le mutazioni, raccolte in tabella 3.6, sono state riscontrate principalmente in casi di bradicardia sinusale e bradiaritmie: in particolare Kyndt et al. [62] riportano, per la mutazione G1408R, una riduzione della frequenza media cardiaca del 13.5% (+15.6% CL).

#### 3.3.2.5 T220I, P1298L, delF1617, R1632H

Nello studio di Benson et al. [17], sono presentate diverse mutazioni associate a bradicardia sinusale e, più in generale, alla sindrome del nodo malato. Tra queste, oltre alle già descritte G1408R e R1623X, vi sono la mutazione T220I (sostituzione treonina→isoleucina al codone 220, causata dalla transizione citosina→timina al nucleotide 559), la P1298L (sostituzione prolina→leucina al codone 1298, dovuta alla variazione citosina→timina al nucleotide 3893), la delF1617 (delezione del codone 1617 codificante per l'amminoacido fenilalani-

na, causata dalla cancellazione dei nucleotidi 4849-4851, timina-timina-citosina) e, infine, la R1632H (sostituzione arginina→istidina al codone 1632, dovuta alla variazione guanina→adenina al nucleotide 4895). Gli autori hanno effettuato la caratterizzazione elettrofisiologica in cellule tsA201 e hanno concluso che le prime tre mutazioni agiscono in modo molto simile tra loro, riducendo la densità di corrente generata dai canali del sodio e alterandone l'inattivazione tramite uno shift iperpolarizzante ed un aumento della costante di tempo. La mutazione R1632H determina, anch'essa, lo shift ed il rallentamento (molto più pronunciato) della cinetica di inattivazione, ma si differenzia dalle precedenti perché non varia l'intensità della corrente (tabella 3.7).

#### **3.3.2.6 D1595H**

La D1595H è una mutazione missenso che si verifica nell'esone 27 del gene SCN5A quando la guanina 4783 viene sostituita da una citosina: questo determina la transizione acido aspartico→istidina al codone 1595. Sia Nguyen et al. [89] che Olson et al. [97] ne riportano l'associazione con bradicardia e cardiomiopatia dilatativa. Espressi in cellule tsA201, i canali mutati mostrano una cinetica di inattivazione alterata (tabella 3.7).

#### **3.3.2.7 L212P**

Makita et al. [74] hanno scoperto, in pazienti affetti da bradicardia, fibrillazione atriale e atrial standstill, una mutazione missenso in cui la transizione da timina a citosina al nucleotide 635 porta alla sostituzione, al codone 212, dell'amminoacido leucina in prolina. Secondo quanto emerso dalle misurazioni effettuate a seguito dell'espressione eterologa in cellule tsA201, tale mutazione ha l'effetto di modificare sia l'attivazione, sia l'inattivazione della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Si veda la tabella 3.7 per maggiore dettaglio.

### 3.3.2.8 Discussione

Le mutazioni nell'isoforma  $Na_v1.5$  del canale voltaggio-dipendente cardiaco  $Na^+$  descritte hanno dimostrato di essere alla base di fenotipi aritmici diversi. In alcuni casi, una singola mutazione può essere associata a più disturbi del ritmo all'interno della stessa famiglia [103]. La varietà di fenotipi è diretta conseguenza della molteplicità di effetti che le mutazioni inducono su questi canali (tabelle 3.3-3.7). La sindrome LQT3 associata a  $Na_v1.5$  deriva dall'inefficacia nell'inattivazione del canale, che, conseguentemente, subisce un guadagno di funzione.

Mutazione		$\Delta KPQ$							
Tipo di espressione		$\alpha+\beta$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	-	-
Attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	-	+9	n. s.	-	+6	-	-	-
	slope (%)	-	+26.8	n. s.	-	+28.4	-	-	-
Inattivazione	$V_{1/2}$ (mV)	n. s.	n. s.	n. s.	-	n. s.	-	-	-
	slope (%)	n. s.	n. s.	n. s.	-	n. s.	-	-	-
	tau (%)	-	n. s.	~-70	n. s.	~+50	<	-	-
Densità di corrente (%)		-	n. s.	-	-	-	n. s.	-	-
Corrente persistente (% del picco)		2-4	0.6	1-4	1.7	2-5	4	-	-
Patologia		IHR, SA, LQT	LQT	LQT	LQT	LQT	LQT	LQT	SB
Riferimento		[12]	[83]	[23]	[37]	[133]	[11]	[134, 135]	[124]

**Tabella 3.3:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *IHR*, low Heart Rate; *SA*, Sinus Arrest; *LQT*, Long QT; *SB*, Sinus Bradycardia;  $\alpha \beta$ , subunità  $\alpha \beta$   $SCN5A$ ; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura); <, variazione in diminuzione.

Mutazione		E161K	D1275N		insD1795-1796			ΔK1500		
Tipo di espressione		$\alpha+\beta$	$\alpha$	$\alpha+\beta$	$\alpha$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	-	$\alpha$	-
Attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	+11.9	+3.8	n. s.	+8.1	n. s.	+9.1	-	+3	-
	slope (%)	+17.9	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	+99.7	-	+73.3	-
Inattivazione	$V_{1/2}$ (mV)	n. s.	n. s.	n. s.	-7.3	-9.7	-19.2	-	-13.4	-
	slope (%)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	-	+29.2	-
	tau (%)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	~+140	-	-	~-70	-
Densità di corrente (%)		-60	n. s.	n. s.	-77.8	-	-62	-	-	-
Corrente persistente (% del picco)		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	1.41	6	-	1.5	-
Patologia		SB, BrS, SSS	SB, AS		SB, BrS, SD, LQT	LQT, BrS	LQT, BrS	SB	SP, BrS, LQT	SB, SND
Riferimento		[112]	[46]		[18]	[123]	[15]	[124]	[45]	[124]

**Tabella 3.4:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *BrS*, Brugada Syndrome; *SSS*, Sick Sinus Syndrome; *AS*, Atrial Standstill; *SD*, Sudden Death; *LQT*, Long QT; *SP*, Sinus Pauses; *SND*, Sinus Node Dysfunction;  $\alpha$   $\beta$ , subunità  $\alpha$   $\beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

L'incompleta inattivazione (una causa è per esempio l'aumento della costante di tempo di inattivazione [103]) determina un'attività sostenuta dei canali e la componente non inattivante di  $I_{Na}$  agisce prolungando la durata del potenziale d'azione e può consentire lo sviluppo di attività aritmogene, come le depolarizzazioni post-postenziali precoci (EADs) [25] o la fibrillazione atriale [103]. In alcuni casi (mutazioni insD1795-1796 e D1790G), per la medesima mutazione, sono riportati risultati contrastanti sulla presenza di una corrente sostenuta: questo può dipende-

Mutazione		D1790G						E1784K			
Tipo di espressione		$\alpha$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	-	$\alpha$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	-
Attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	n. s.	n. s.	+5.4	+6	-	-	-	-	+8.8	-
	slope (%)	n. s.	n. s.	+53	+33.3	-	-	-	-	+78.1	-
Inattivazione	$V_{1/2}$ (mV)	n. s.	-16.3	-14.6	-15	-15.6	-	-5.3	-12.1	-14.4	-
	slope (%)	n. s.	-37.2	n. s.	n. s.	-	-	-	-	+10.5	-
	tau (%)	n. s.	n. s.	-	~-50	-	-	~+90	~-20	n. s.	-
Densità di corrente (%)		n. s.	-17.2	n. s.	-	-	-	-	-	-	-
Corrente persistente (% del picco)		n. s.	n. s.	6	n. s.	-	-	2-4	2-4	1.5	-
Patologia		IHR, SA, LQT		LQT, BrS	IHR, LQT	LQT	SB	SB, LQT		SB, LQT	SB
Riferimento		[12]		[15]	[136]	[7]	[124]	[137]		[29]	[124]

**Tabella 3.5:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *IHR*, low Heart Rate; *SA*, Sinus Arrest; *LQT*, Long QT; *SB*, Sinus Bradycardia;  $\alpha \beta$ , subunità  $\alpha \beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

re dalle condizioni sperimentali a contorno (per esempio concentrazioni ioniche, temperatura) o anche dal sistema di espressione scelto (linea cellulare).

Diversamente dalla LQTS, che è associata a mutazioni di tipo gain of function, la perdita di funzionalità del canale è, per esempio, alla base della sindrome di Brugada. La BrS è caratterizzata da blocco di branca destra, sopraslivellamento del tratto ST dell'ECG e tachiaritmie ventricolari, spesso con conseguente morte improvvisa [103]. Le mutazioni collegate a BrS causano una riduzione di  $I_{Na}$  velocizzandone l'inattivazione [25] o alterando il processamento dei canali per la loro espressione sulla membrana cellulare [103]. Al contrario, le mutazioni di-

Mutazione		G1408R		R1623X		T187I	K1578fs/52	W1421X
Tipo di espressione		$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	-
Attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	-	-	-	-	-	-	-
	slope (%)	-	-	-	-	-	-	-
Inattivazione	$V_{1/2}$ (mV)	-	-	-	-	-	-	-
	slope (%)	-	-	-	-	-	-	-
	tau (%)	-	-	-	-	-	-	-
Densità di corrente (%)		-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100
Corrente persistente (% del picco)		-	-	-	-	-	-	-
Patologia		SB	SB, BrS	SB, SSS	BA, BrS	BA, BrS	BA, BrS	SB, SD
Riferimento		[17]	[62]	[17]	[75]	[75]	[75]	[91]

**Tabella 3.6:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *BrS*, Brugada Syndrome; *SSS*, Sick Sinus Syndrome; *BA*, Bradiaritmia; *SD*, Sudden Death;  $\alpha \beta$ , subunità  $\alpha \beta$  SCN5A; -, valore non riportato.

mostrate essere causa di difetti di conduzione determinano, tipicamente, uno shift depolarizzante della curva di attivazione del canale, che, quindi, richiede più tempo per raggiungere i valori di potenziale ai quali si ha la massima corrente. Questo si traduce, inoltre, in una riduzione della velocità di salita del potenziale d'azione, determinante primaria della velocità di conduzione [25]. Altri fenotipi loss of function del canale di sodio sono dovuti a spostamenti verso potenziali più negativi della curva di inattivazione, oppure ad una minore densità della corrente ionica generata, a causa della ridotta espressione dei canali o del loro assemblaggio non funzionale che, nei casi più estremi, porta alla totale perdita di funzionalità, risul-

Mutazione		T220I	P1298L	delF1617	R1632H	D1595H		L212P
Tipo di espressione		$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	-	$\alpha+\beta$
Attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	n. s.	-	-15.4				
	slope (%)	n. s.	-	n. s.				
Inattivazione	$V_{1/2}$ (mV)	-4.4	-12.3	-11.4	-14.6	-6.8	-	-9
	slope (%)	n. s.	-	-8.3				
	tau (%)	~+30	~+30	~+30	~+800	+200	-	n. s.
Densità di corrente (%)		-22.2	-44.3	-51.5	n. s.	n. s.	-	n. s.
Corrente persistente (% del picco)		-	-	-	-	n. s.	-	n. s.
Patologia		SB, SSS	SB, SSS	SB, SSS	SB, SSS	SB, DCM	SB, DCM	SB, pAF, AS
Riferimento		[17]	[17]	[17]	[17]	[89]	[97]	[74]

**Tabella 3.7:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *SSS*, Sick Sinus Syndrome; *DCM*, Dilated Cardiomyopathy; *pAF*, paroxysmal Atrial Fibrillation; *AS*, Atrial Standstill;  $\alpha\beta$ , subunità  $\alpha\beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

tante nel fenotipo cosiddetto *non-function* (tabella 3.6).

Il meccanismo cellulare sottostante le bradiaritmie consiste in un rallentamento dell'attività pacemaker o in una riduzione della propagazione dell'impulso. Un difetto funzionale nel canale del sodio può portare ad una riduzione della propagazione dell'impulso in prossimità del nodo senoatriale: infatti i canali  $Na_v1.5$  si distribuiscono maggiormente nella periferia del SAN [75]. Inoltre, essi sono localizzati anche a livello dei dischi intercalari posti tra miociti adiacenti [74] e questo può rappresentare un'ulteriore causa dei problemi di conduzione dell'im-

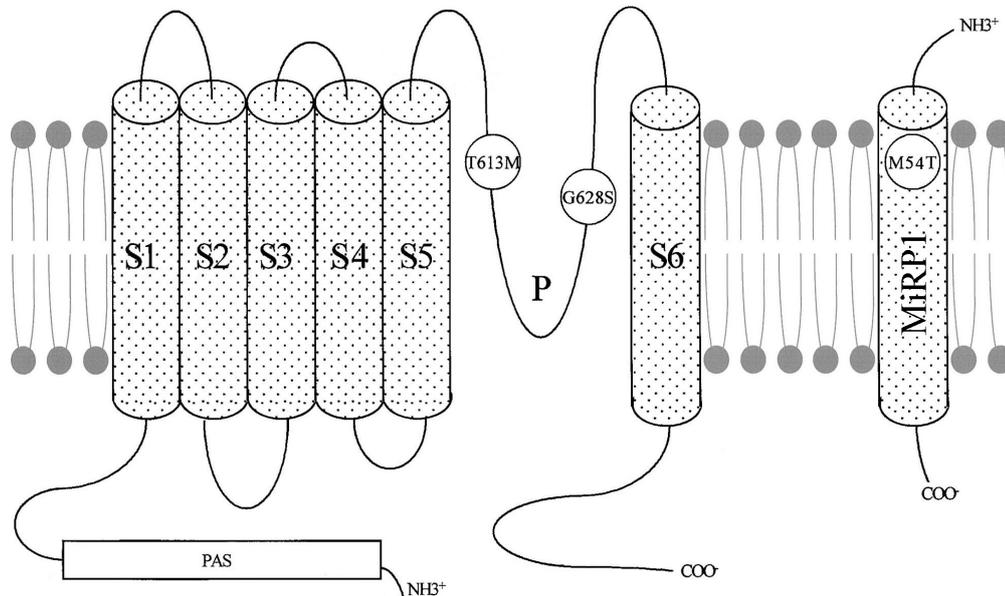
pulso legati a mutazioni di questi canali. Il meccanismo sottostante la bradicardia associata ad LQT3, invece, non è ancora stato chiarito [124].

Anche se la comprensione delle canalopatie del sodio è sostanzialmente aumentata negli ultimi anni, alcune importanti questioni rimangono aperte. È diventato sempre più chiaro come la funzione e la regolazione del canale del sodio siano più complicate di quanto tradizionalmente ipotizzato. Il fatto, per esempio, che le mutazioni del gene *SCN5A* siano state recentemente associate anche alla cardiomiopatia dilatativa, suggerisce che i canali  $\text{Na}_v1.5$  possano ricoprire un ruolo non ancora riconosciuto nella funzionalità dei cardiomiociti [103]. Per quanto riguarda, invece, il pacemaking del nodo senoatriale, la possibile funzione della corrente  $I_{\text{Na}}$  risulta incerta ad oggi. Essa può risultare inattivata ai potenziali di membrana relativamente positivi misurati nelle cellule SAN ed è stata soprattutto registrata nella periferia del nodo. Inoltre, bloccaggi di  $I_{\text{Na}}$  tramite tetrodotossina (TTX) hanno effetto lieve o nullo sul potenziale d'azione [68]. Tuttavia, recenti studi evidenziano forti correlazioni tra disfunzioni del nodo senoatriale umano e difetti del canale di sodio  $\text{Na}_v1.5$  (in particolare le mutazioni di tipo loss of function del gene *SCN5A*), indicando un ruolo di maggiore importanza per questo canale nell'attività di pacemaking senoatriale nell'uomo [68].

### 3.3.3 Mutazioni dei canali del potassio

I canali ionici voltaggio-dipendenti permeabili al potassio sono vari e dalle proprietà distinte. Tra questi vi sono i canali  $\text{K}_v11.1$  (codificati dal gene *hERG*, *human Ether-à-go-go-Related Gene*) e  $\text{K}_v7.1$  (o  $\text{K}_v\text{LQT1}$ , codificati dal gene *KCNQ1*), responsabili delle correnti  $I_{\text{Kr}}$  e  $I_{\text{Ks}}$  rispettivamente. Entrambi si formano per co-assemblaggio di quattro subunità  $\alpha$ , ognuna delle quali consiste in sei segmenti transmembrana (S1-S6). Di questi, i primi quattro (S1-S4) compongono il dominio sensibile alle variazioni del potenziale di membrana, mentre i segmenti

S5 e S6, insieme all'ansa proteica che li unisce, formano il poro conduttivo (figure 3.7 e 3.8).

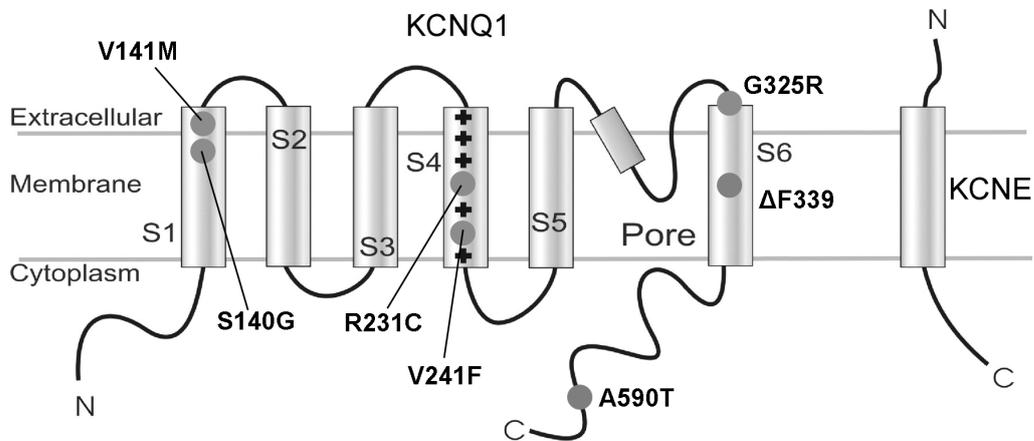


**Figura 3.7:** Topologia schematica del canale  $K_v11.1$  codificato dal gene hERG e della subunità MiRP1. Indicate vi sono le posizioni dei siti delle mutazioni di hERG associate a bradicardia fetale e di MiRP1 associata a bradicardia sinusale.

Le estremità amminica e carbossilica della proteina hERG sono entrambe citosoliche e contengono rispettivamente il dominio Per-Arnt-Sim (PAS) e un dominio di legame per i nucleotidi ciclici (cNBD). Il primo influenza la cinetica di inattivazione (lenta), mentre il secondo non sembra regolare l'attività del canale (contrariamente a quanto avviene nei canali HCN). Infine, la proteina MiRP1 codificata dal gene KCNE2 funziona come subunità  $\beta$  del canale  $K_v11.1$ , modulandone l'attività [6].

In condizioni fisiologiche la funzione del canale  $K_v7.1$  è regolata dal legame con la proteina transmembrana minK, codificata dalla famiglia di geni KCNE.

Una notevole quantità di mutazioni è stata individuata nei geni che codificano per i canali responsabili delle correnti  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ : trattandosi di correnti ripolarizzan-



**Figura 3.8:** Topologia schematica del canale  $K_v7.1$  codificato dal gene *KCNQ1*. I punti grigi indicano la posizione dei siti delle mutazioni di *KCNQ1* associate a bradicardia sinusale e bradicardia fetale.

ti per il potenziale d'azione cardiaco umano, mutazioni di tipo loss of function in questi canali determinano, tipicamente, sindromi quali quella del QT lungo; fenotipi gain of function sono, invece, responsabili della sindrome del QT corto e della fibrillazione atriale. Di seguito sono riportate alcune mutazioni dei geni *hERG* e *KCNQ1* riscontrate in associazione a bradiaritmie (bradicardia sinusale e bradicardia fetale).

### 3.3.3.1 T613M e G628S

Lupoglazoff et al. [73] hanno riportato una serie di mutazioni relative al gene *hERG* e associate alla sindrome del QT lungo neonatale con bradicardia fetale. Tra queste vi sono la mutazione T613M (sostituzione della treonina 613 con metionina, dovuta alla transizione citosina→timina al nucleotide 1838) e la mutazione G628S (variazione glicina→serina al codone 628, causata dalla transizione da guanina ad adenina al nucleotide 1882). Gli autori non hanno effettuato la caratterizzazione elettrofisiologica dei canali mutati, ma da altri studi emerge che entrambe sono mutazioni di tipo loss of function. Nel primo caso Huang

et al. [52] documentano una marcata riduzione della corrente; nel secondo caso più autori concordano nel fatto che la mutazione produca canali non funzionali [38, 105, 142] (tabella 3.8).

### 3.3.3.2 M54T

La mutazione M54T è già stata descritta al paragrafo 3.3.1 ed elencata tra le mutazioni dei canali HCN4 associate a bradicardia sinusale e LQTS. Poiché la proteina MiRP1 (bersaglio di questa mutazione) funge da subunità regolatrice non solo per i canali HCN4, ma anche per quelli codificati dal gene hERG, in tabella 3.8 sono stati raccolti gli effetti misurati anche sulla corrente  $I_{Kr}$  [6, 71].

### 3.3.3.3 S140G, $\Delta$ F339 e V241F

Le mutazioni del gene KCNQ1 S140G (sostituzione serina→glicina al residuo 140, a causa della transizione da adenina a guanina al nucleotide 418),  $\Delta$ F339 (delezione della fenilalanina 339 per via della cancellazione dei nucleotidi 1014-1016, citosina-timina-timina) e V241F (sostituzione valina→fenilalanina al residuo 241, dovuta alla transversione guanina→timina in posizione 721) sono state riscontrate in pazienti bradicardici: nello specifico sono riportate frequenze cardiache minime di 43 bpm nel caso  $\Delta$ F339 [119] e di 30-36 bpm nel caso V241F [60]. Gli effetti misurati sono diversi tra loro e sono riassunti nelle tabelle 3.9, 3.10 e 3.11.

### 3.3.3.4 G325R, V141M e R231C

Nel gene KCNQ1, la transizione da guanina ad adenina al nucleotide 973 causa la variazione glicina→arginina al residuo 325 (G325R); la stessa transizione in posizione 421 determina la sostituzione di valina in metionina al codone 141

(V141M); la variazione citosina→timina al nucleotide 691 provoca la sostituzione dell'arginina 231 in cisteina (R231C). Queste mutazioni missenso sono state associate a casi di bradicardia fetale [16, 50, 73]. Inoltre Henrion et al. [48] hanno riscontrato la mutazione R231C anche in soggetti bradicardici (46-61 bpm). Per il dettaglio sugli effetti riscontrati si vedano le tabelle 3.9, 3.10 e 3.11.

### 3.3.3.5 Discussione

Le mutazioni del gene hERG descritte, collegate a bradicardia fetale, sono di tipo loss of function (tabella 3.8). La diminuzione dell'intensità della corrente

Mutazione		T613M			G628S				M54T*	
Tipo di espressione		om.	et.	-	om.	et.	et.	-	om.*	om.*
Attivazione	V <sub>1/2</sub> (mV)	-	n. s.	-	-	-	-	-	+10	n. s.
	slope (%)	-	n. s.	-	-	-	-	-	-	-24
Inattivazione	V <sub>1/2</sub> (mV)	-	-6	-	-	-	-	-	-8.1	n. s.
	slope (%)	-	n. s.	-	-	-	-	-	-	n. s.
	τ <sub>fast</sub> (%)	-	+35	-	-	-	-	-	n. s.	-54
	τ <sub>slow</sub> (%)	-	+42	-	-	-	-	-	~+15	-45
Densità di corrente (%)		-100	~-71	-	-100	-100	-85	-	n. s.	n. s.
Patologia		-		fSB, LQT	-	-	-	fSB, LQT	LQT	LQT
Riferimento		[52]		[73]	[38, 105, 117, 142]	[105]	[117]	[73]	[71]	[6]

**Tabella 3.8:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio I<sub>Kr</sub>. Abbreviazioni e simbologia: *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; \*, mutazione di MiRP1; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); *om.\**, espressione di HERG (omozigote) + MiRP1; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

Mutazione		S140G			G325R					
Tipo di espressione		om.*	om.**	om.***	-	om.	et.	et.*	om.*	et.*
Attivazione	V <sub>1/2</sub> (mV)	-	-	-	-	-	-	+12	-	n. s.
	slope (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	n. s.
	tau (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Densità di corrente (%)		+197	+446	n. s.	-	-100	-71.1	-52.9	-100	-62.5
Patologia		SB, AF			fSB, LQT	LQT			sincope, LQT	
Riferimento		[24]			[73]	[8]			[21]	

**Tabella 3.9:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio I<sub>Ks</sub>. Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *AF*, Atrial Fibrillation; *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di KCNE1 in aggiunta a KCNQ1; \*\*, espressione di KCNE2 in aggiunta a KCNQ1; \*\*\*, espressione di KCNE3 in aggiunta a KCNQ1; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato.

attraverso i canali mutati T613M è dovuta ad alterazioni nel processamento della proteina e alla riduzione del trafficking verso la membrana cellulare [52]. La mutazione G628S genera, invece, canali K<sub>v</sub>11.1 non conduttivi: il motivo sembra essere, secondo Es-Salah-Lamoureux et al. [38], una modifica nella selettività del canale, piuttosto che l'alterazione delle cinetiche di apertura/chiusura. Essi, infatti, hanno notato che, in condizioni di concentrazioni fisiologiche di potassio, i canali mutati non conducono corrente; al contrario questi mostrano un'anomala permeabilità al sodio quando le concentrazioni intracellulare ed extracellulare di Na<sup>+</sup> risultano equimolari.

I dati riportati in tabella 3.8 in merito alla mutazione M54T provengono da studi effettuati su pazienti affetti da sindrome del QT lungo ed evidenziano come il

Mutazione		V141M			ΔF339			
Tipo di espressione		om.	om.*	et.*	om	et.	om.*	et.*
Attivazione	V <sub>1/2</sub> (mV)	n. s.	costituti-	inter-	-	-	-	+25
	slope (%)	n. s.	vamente	medio	-	-	-	n. s.
	tau (%)	-	aperti	mut/wt	-	-	-	-
Densità di corrente (%)		n. s.	-	-	~-85	n. s.	~-100	-69.5
Patologia		fSB, AF			SB, sincope, LQT			
Riferimento		[50]			[119]			

**Tabella 3.10:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Ks}$ . Abbreviazioni e simbologia: *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *AF*, Atrial Fibrillation; *SB*, Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di *KCNE1* in aggiunta a *KCNQ1*; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

fenotipo dei canali di  $I_{Kr}$  sia loss of function, anche se con effetti singoli diversi: da una lato gli shift in direzioni opposte delle curve di attivazione e inattivazione riducono la *window current*; dall'altro lato, oltre ad una maggiore ripidità della curva di attivazione (riduzione del fattore di slope), l'inattivazione è resa molto più veloce. La stessa mutazione è riportata da Nawathe et al. [87] in soggetti bradicardici, ma, in questo caso, gli autori si sono concentrati sulle alterazioni della corrente  $I_f$  (paragrafo 3.3.1).

Per quanto riguarda le mutazioni riscontrate nel gene *KCNQ1* dei canali responsabili della corrente  $I_{Ks}$ , è possibile notare una certa variabilità negli effetti riportati (tabelle 3.9-3.11). Per esempio, le mutazioni associate a bradicardia sinusale sono di tipo sia gain che loss of function. L'aumento di funzione è dato da una maggiore densità di corrente misurata [24], oppure da marcati shift iperpolarizzanti della

Mutazione		R231C					V241F
Tipo di espressione		-	om.*	et.*	om	om.*	om.*
Attivazione	$V_{1/2}$ (mV)	-	costituti-	~-41	~+150	-	-42.2
	slope (%)	-	vamente	n. s.	~+300	-	+52.9
	tau (%)	-	aperti	-	~+100	-	~+500
Densità di corrente (%)		-	-	-	~-70	~+1900	-
Patologia		fSB, LQT	fSB, AF		SB, LQT, AF		SB, AF
Riferimento		[73]	[16]		[48]		[60]

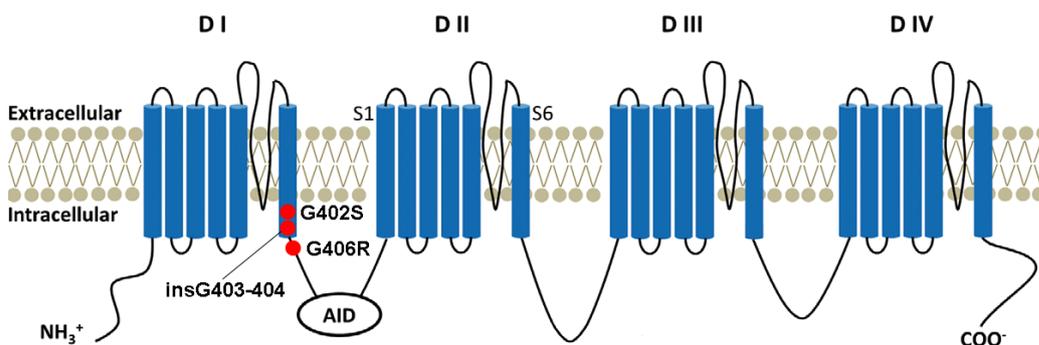
**Tabella 3.11:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{KS}$ . Abbreviazioni e simbologia: *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; *AF*, Atrial Fibrillation; *SB*, Sinus Bradycardia; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di KCNE1 in aggiunta a KCNQ1; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

curva di attivazione che rendono, di fatto, i canali costitutivamente aperti [16, 60]. Al contrario, il fenotipo loss of function è abbinato ad una ridotta espressione della corrente [21] e/o a shift depolarizzanti dell'attivazione steady-state [8, 48, 119].

### 3.3.4 Mutazioni del canale del calcio

I canali voltaggio-dipendenti del calcio sono complessi macromolecolari formati da una proteina centrale (subunità  $\alpha$ ) e da peptidi accessori (subunità  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Le subunità  $\alpha$   $Ca_v1.1$ - $1.4$  sono quelle che conducono la corrente di tipo L. Nei cardiomiociti è predominante l'isoforma  $Ca_v1.2$  codificata dal gene *CACNA1C*, mentre i geni *CACNB2b* e *CACNA2D* codificano rispettivamente per le subunità  $\beta_2$  e  $\alpha_2\delta$ ; la subunità  $\gamma$  non è espressa nel cuore [85]. Nel canale LTCC

(*L-Type Calcium Channel*) cardiaco il poro conduttivo è costituito dalla subunità  $\alpha_1$   $\text{Ca}_v1.2$ , la quale contiene quattro domini omologhi (DI-DIV), ognuno composto da sei segmenti transmembrana (S1-S6) connessi tra loro da anse proteiche (figura 3.9). Le estremità N- e C-terminali sono rivolte verso il compartimento intracellulare; le subunità  $\text{Ca}_v\beta$  e  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  giocano un ruolo duale nella regolazione delle proprietà biofisiche e nel trafficking del canale [85].



**Figura 3.9:** Topologia schematica dei canali  $\text{Ca}_v1.1-1.4$  codificati dai geni *CACNA1*. I punti rossi indicano la posizione dei siti delle mutazioni di *CACNA1* associati a bradicardia sinusale e bradicardia fetale.

Di seguito verranno presentate alcune mutazioni del canale di tipo L del calcio riscontrate in casi di patologie varie in concomitanza con bradicardia o bradicardia fetale. Quest'ultima è definita come frequenza cardiaca inferiore a 100 battiti al minuto, data la più alta frequenza basale nel feto (110-160 bpm).

### 3.3.4.1 G402S e G406R

Splawski et al. [114] nel 2005 hanno studiato due casi di mutazione missenso del canale  $\text{Ca}_v1.2$  scoperte in pazienti affetti da sindrome di Timothy e soggetti a diversi tipi di aritmie: bradicardia precedentemente diagnosticata in fase gestazionale (25 settimane), prolungamento dell'intervallo QT e ripetuti episodi di arresto cardiaco. L'analisi genetica dell'esone 8 del gene *CACNA1C* ha rivelato

una transizione da guanina ad adenina ai nucleotidi 1204 e 1216 (ognuna in un paziente distinto) che determina la sostituzione di glicina in serina al residuo 402 (G402S) e di glicina in arginina al residuo 406 (G406R) rispettivamente. Per mezzo dell'espressione di canali  $Ca_v1.2$  wild-type e mutati in ovociti di *Xenopus*, gli autori hanno caratterizzato elettrofisiologicamente le mutazioni, riportando, come effetto principale, la quasi totale riduzione nell'entità dell'inattivazione voltaggio-dipendente (mentre persiste quella calcio-dipendente), che produce una corrente sostenuta. Il risultato sulla mutazione G406R conferma quanto già scoperto l'anno precedente dallo stesso gruppo [115]. Il dettaglio degli effetti misurati è presentato in tabella 3.12.

#### 3.3.4.2 insG403-404

La mutazione in questione è stata riscontrata nell'isoforma  $Ca_v1.3$  della subunità  $\alpha$  dei canali LTCC e consiste nell'inserzione di tre guanine tra i nucleotidi 1208 e 1209 dell'esone 8 del gene *CACNA1D*, la quale aggiunge l'amminoacido glicina alla sequenza peptidica originaria, tra i peptidi 403 e 404 (insG403-404). Tale mutazione è stata riscontrata da Baig et al. [13] su pazienti bradicardici (38-52 bpm) e colpiti da sordità ed è stata caratterizzata esprimendo i canali in cellule tsA201. Nel caso di omozigosi (come rilevato sui pazienti) è risultata una perdita di funzionalità dei canali. La tabella 3.12 elenca nello specifico gli effetti della mutazione.

#### 3.3.4.3 Discussione

Le mutazioni del canale di tipo L del calcio descritte sono sia di tipo gain of function, sia loss of function (tabella 3.12). Il primo tipo è spesso associato alla sindrome di Timothy (TS, *Timothy Syndrome*). La TS è un disturbo multisistemico caratterizzato da aritmie cardiache (come l'allungamento del tratto QT

Mutazione		G406R		G402S	insG403-404
Tipo di espressione		et.	et.	et.	om.
Attivazione	V <sub>1/2</sub> (mV)	-8.9	-3	n. s.	-16.2
	slope (%)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	tau (%)	-	-	-	~-40
Inattivazione	V <sub>1/2</sub> (mV)	no inattivazione	no inattivazione	no inattivazione	-
	slope (%)	volt-dipendente	volt-dipendente	volt-dipendente	-
	tau (%)	-	~-70	-	-
Densità di corrente (%)		-	-	-	~-95
Corrente sostenuta		si	si	si	no
Patologia		TS, fSB, QTp	TS	TS, fSB, QTp	SB, sordità
Riferimento		[114]	[115]	[114]	[13]

**Tabella 3.12:** Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di calcio I<sub>CaL</sub>. Abbreviazioni e simbologia: *TS*, Timothy Syndrome; *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *QTp*, QT interval prolongation; *SB*, Sinus Bradycardia; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura).

dell'ECG), da segni a carico degli arti (sindattilia) e del volto, e a carico dello sviluppo neurologico (come disturbi dello spettro dell'autismo) [114]. Essendo i canali del calcio espressi in maniera diffusa in molti tessuti dell'organismo, la loro disfunzione spiega la multisistemicità di tale sindrome. Per quanto riguarda il cuore, il prolungamento dell'intervallo QT in presenza della sindrome di Timothy è dovuto alla corrente sostenuta di calcio che fluisce attraverso i canali L-type mutati, nei quali risulta inefficiente l'inattivazione voltaggio-dipendente, ma sui quali continua ad influire la sola e più lenta inattivazione dipendente dalla concentra-

zione di calcio [114, 115]. La bradicardia fetale riscontrata in concomitanza con la TS, in quanto anomalia del cuore non maturo dal punto di vista funzionale, è di difficile interpretazione, ma può derivare dal prolungamento del tratto QT piuttosto che da una disfunzione diretta del nodo senoatriale.

Infine, risulta non chiaro il meccanismo per cui la mutazione dell'isoforma  $Ca_v1.3$  del canale [13] risulti in un fenotipo loss of function: nonostante lo shift negativo della curva di attivazione e la riduzione della costante di tempo associata siano elementi che favoriscono un aumento della corrente, si può concludere che la mutazione ostacoli in qualche modo la permeabilità del canale, anche se questo si apre correttamente [13]. Come conseguenza, la riduzione di  $I_{CaL}$  è riportata essere la causa della bradicardia riscontrata (oltre che della sordità, in quanto  $Ca_v1.3$  è espresso anche nelle cellule ciliate interne cocleari [13]): gli autori di questa scoperta indicano, quindi, un possibile ruolo di tale corrente nel controllo della frequenza cardiaca, perlomeno in condizioni patologiche [13].

### 3.4 Considerazioni finali

Nei paragrafi precedenti sono state descritte numerose mutazioni dei geni codificanti per i canali HCN4,  $Na_v1.5$ ,  $K_v11.1$ ,  $K_v7.1$  e  $Ca_v1.2-1.3$ , associate a varie sindromi aritmiche e con effetti macroscopici sulla frequenza cardiaca (bradiaritmie). Lo studio delle mutazioni genetiche avviene per mezzo di tecniche quali la mutagenesi e l'espressione eterologa dei canali ionici in linee di coltura cellulari. Sebbene i canali ionici geneticamente clonati siano un potente strumento di indagine elettrofisiologica nell'analisi delle caratteristiche dei canali stessi e rappresentino una fonte facile e veloce di dati sperimentali, vi sono prove secondo le quali i corrispettivi canali naturali risultino da un complesso co-assemblaggio di subunità principali ed accessorie, che ne modificano il livello di espressione,

nonché le proprietà elettriche e le dinamiche di attivazione e inattivazione. Pertanto, non sono da escludere possibili deviazioni dei risultati ottenuti in vitro dai fenomeni e dalle interazioni molecolari così come avvengono nelle condizioni fisio-patologiche in vivo.

# Capitolo 4

## Analisi modellistica

### Introduzione

Dopo aver descritto, nei capitoli precedenti, le caratteristiche del tessuto atriale umano (composto da cellule specializzate e non), averne raccontato le basi elettrofisiologiche dei potenziali d'azione caratteristici e dopo aver approfondito maggiormente il discorso sulle cellule specializzate del nodo senoatriale umano, in questo capitolo verranno introdotti i modelli matematici di potenziale d'azione di cellula atriale non specializzata Koivumäki et al. [61] e Grandi et al. [43], descrivendone le principali caratteristiche e differenze. Successivamente saranno presentati i passi che hanno portato allo sviluppo del modello matematico di potenziale d'azione di SAN umano oggetto di questo lavoro di tesi.

### 4.1 Modelli atriali umani non specializzati

La conoscenza delle basi ioniche del potenziale d'azione atriale si è evoluta continuamente da quando le prime registrazioni transmembrana furono eseguite su campioni isolati da tessuto atriale umano quasi 50 anni fa [100]. L'avvento

della tecnica del patch-clamp agli inizi degli anni '80 e la successiva caratterizzazione delle proprietà biofisiche delle varie correnti ioniche nei cardiomiociti atriali umani hanno portato allo sviluppo dei primi modelli matematici dettagliati di potenziale d'azione atriale nel 1998 [26, 94]. Tali modelli si basano principalmente sugli stessi dati da cellule umane, ma, in parte, dipendono da misure sperimentali da altri mammiferi ed hanno formulazioni di correnti ioniche, pompe e scambiatori leggermente diverse, con conseguenti divergenze nella morfologia degli AP [34, 138]. Tutto questo è stato poi seguito da un primo aggiornamento, nel 2009, focalizzato a migliorare le formulazioni delle correnti ripolarizzanti e la dipendenza dell'AP dalla frequenza [76] e, in seguito, da una più approfondita conoscenza sul ruolo importante dell'omeostasi del calcio intracellulare nell'influenzare la ripolarizzazione atriale sia in condizioni fisiologiche che patologiche, soprattutto nella fibrillazione atriale. Il risultato sono state le formulazioni dei più recenti modelli quantitativi del 2011, che incapsulano le interazioni non lineari tra le correnti ioniche e la concentrazione  $[Ca^{2+}]_i$ , per simulare l'accoppiamento eccitazione-contrazione atriale umano [43, 61]. Alcuni studi hanno, inoltre, documentato variazioni regionali nell'elettrofisiologia atriale e le basi ioniche del rimodellamento che si verifica come risultato della fibrillazione atriale o altri tipi di disfunzione [34, 100].

In questo lavoro di tesi verranno presi in considerazione i modelli Koivumäki et al. (*Koivumäki*) e Grandi et al. (*Grandi*) per la simulazione di potenziali d'azione di miociti atriali non specializzati, in quanto più recenti e dettagliati e saranno presentati nei paragrafi seguenti.

#### **4.1.1 Koivumäki et al. 2011**

Il modello di miocita atriale umano pubblicato da Koivumäki et al. nel 2011 [61] è stato sviluppato con l'obiettivo di fornire una descrizione spazialmente e

fisiologicamente dettagliata del rilascio e recupero di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico e di studiarne l'influenza sulla dinamica di  $\text{Ca}^{2+}$  e sulla morfologia del potenziale d'azione.

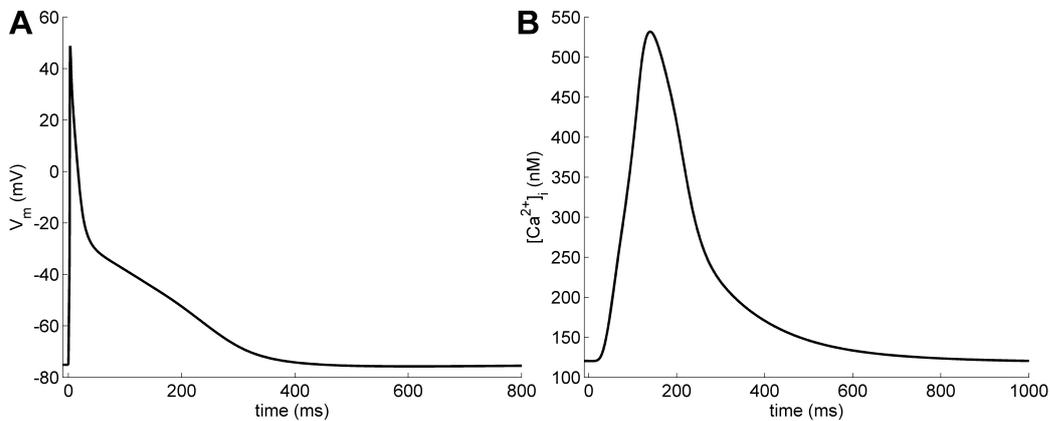
Lo spazio intracellulare è suddiviso in una stretta regione subsarcolemmale, detta *junctional citosol*, che separa la membrana cellulare dall'effettivo compartimento intracellulare detto *bulk citosol* (figura 4.3B). A sua volta, il bulk citosol e, al suo interno, il reticolo sarcoplasmatico sono divisi in quattro sottocompartimenti in successione, dei quali solo il più "esterno" si affaccia al junctional citosol. I canali RyR e le pompe SERCA appartenenti ai tre sottocompartimenti "interni", non collegati al junctional citosol, interagiscono con i rispettivi sottocompartimenti del bulk citosol (figura 4.3B).

Il modello Koivumaki adotta le formulazioni delle correnti ioniche previste dal modello Nygren et al. [94] a meno di aggiustamenti minori dei parametri. In particolare implementa le correnti depolarizzanti  $I_{\text{Na}}$  e  $I_{\text{CaL}}$ , le correnti ripolarizzanti  $I_{\text{to}}$  e  $I_{\text{sus}}$  attive nella fase 1 dell'AP e  $I_{\text{K1}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$  e  $I_{\text{Ks}}$  attive nelle fasi 2 e 3; oltre allo scambiatore sodio-calcio  $I_{\text{NaCa}}$  e alla pompa sodio-potassio  $I_{\text{NaK}}$ , sono presenti la pompa di calcio di sarcolemma (PMCA) e correnti di background di sodio e calcio; infine il modello include anche la corrente funny  $I_{\text{f}}$  (figura 4.3A).

L'AP risultante ha una forma tipica atriale (figura 4.1A), anche se con una fase di plateau spostata a potenziali più negativi per via della ripolarizzazione transiente che termina attorno a -30 mV. I parametri della forma d'onda del potenziale d'azione sono riassunti in tabella 4.1.

Data l'ipotesi degli autori di assenza di un sistema di tubuli trasversali nelle cellule atriali, il segnale dell'aumento di calcio nella cellula non è omogeneo in tutti i compartimenti del bulk citosol: questo provoca un ritardo tra il rilascio dal reticolo sarcoplasmatico periferico e da quello centrale, che determina un andamento bifasico dell'upstroke del transiente di  $\text{Ca}^{2+}$ . Dunque, rispetto agli altri modelli

atriali in letteratura, il transiente di calcio ha una crescita più lenta, ma una durata maggiore (figura 4.1B).



**Figura 4.1:** Potenziale d'azione (A) e transiente di calcio (B) del modello Koivumäki a 1 Hz.

L'impatto della dinamica di  $[Ca^{2+}]_i$  sulla morfologia del potenziale d'azione è stato studiato alterando l'intensità dell'attività dei canali RyR. Koivumäki et al. hanno così riscontrato che l'ampiezza del transiente di calcio condiziona la durata dell'AP: aumentando di tre volte il rilascio, la fase 1 diviene più rapida, mentre la ripolarizzazione terminale rallenta (l'annullamento del rilascio ha, invece, effetti opposti). Questo aumenta il tempo di permanenza dei canali del sodio nello stato di inattivazione, prolungando il periodo refrattario.

Sperimentalmente si osserva, per frequenze di stimolazione crescenti, un decremento della durata del potenziale d'azione, imputato a variazioni funzionali dei canali di calcio L-type ed al conseguente accumulo dello ione [26]. Tenuto conto che, nei cardiomiociti ventricolari, anche l'accumulo di sodio citosolico ad elevate frequenze di stimolazione è stato indicato come un fattore determinante nell'alterazione dell'APD, gli autori hanno implementato due varianti del modello al fine di identificare il contributo dei singoli meccanismi all'adattamento in frequenza. Nonostante sia ampia la varianza dei valori assoluti di  $APD_{90}$  in funzione

del cycle-length riportata in letteratura, per entrambe le varianti l'andamento delle curve in simulazione riproduce quello sperimentale. Inoltre, Koivumäki et al. evidenziano come il tempo totale di simulazione sia un fattore influente nello studio della dipendenza della morfologia dell'AP dalla frequenza di stimolazione: all'aumentare della durata delle simulazioni, i valori di APD<sub>90</sub>, ai medesimi CL, sono minori. Il tempo di simulazione condiziona l'accumulo di sodio, infatti, qualora  $[Na^+]_i$  sia fissata al proprio valore di riposo, l'effetto delle alte frequenze sull'APD si riduce, delineando come l'accumulo di sodio sia condizione necessaria per l'adattamento in frequenza della durata del potenziale d'azione.

Infine, gli autori hanno riscontrato che, al ridursi dell'afflusso di calcio attraverso i canali L-Type per frequenze di stimolazione crescenti, l'ingresso di  $Ca^{2+}$  tramite lo scambiatore sodio-calcio aumenta considerevolmente, mentre il blocco di  $I_{NaCa}$  in questa modalità inversa ritarda il raggiungimento del picco di  $[Ca^{2+}]_i$  proporzionalmente alla frequenza di stimolazione: la modulazione frequenza-dipendente dello scambiatore potrebbe, quindi, mediare la riduzione del ritardo tra eccitazione elettrica e picco del transiente di calcio.

#### 4.1.2 Grandi et al. 2011

Il modello Grandi et al. [43] è il modello atriale umano più recentemente pubblicato e si basa su un modello ventricolare umano del medesimo gruppo [44], che, a sua volta, deriva dal modello ventricolare di coniglio di Shannon et al. [110]. Il Grandi atriale è stato originariamente sviluppato per analizzare le differenze strutturali ed elettrofisiologiche tra cardiomiociti atriali e ventricolari umani, con un focus sulla gestione del calcio intracellulare [34, 138]. È stato, inoltre, impiegato nella comprensione dei meccanismi di adattamento in frequenza della durata del potenziale d'azione e del transiente di calcio, nei casi di ritmo sinusale e fibrillazione atriale cronica.

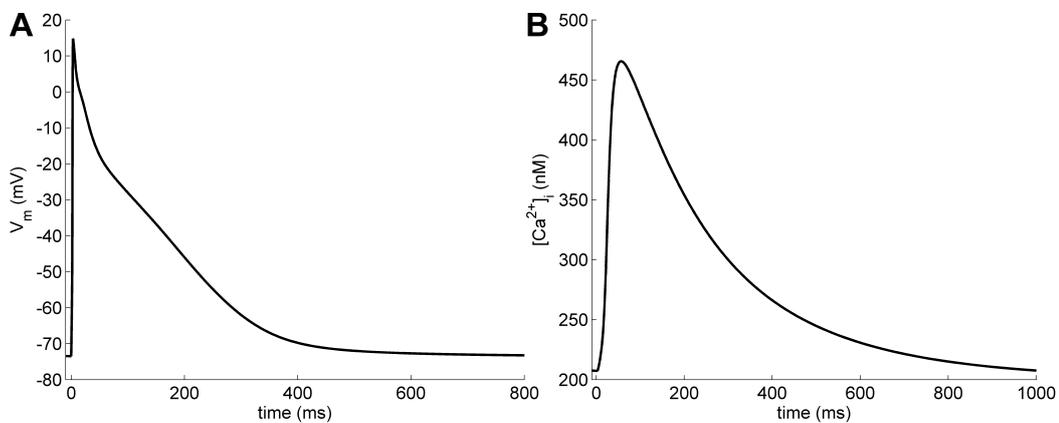
La compartimentazione intracellulare è identica a quella del modello di Shannon et al. e comprende uno spazio subsarcolemmale che accentua gli scostamenti nella concentrazione di calcio rispetto al bulk citosol e un sottospazio ancora più ristretto, detto *cleft*, in cui ha luogo l'accoppiamento tra i canali RyR e quelli L-type del calcio (figura 4.3B).

La maggior parte delle formulazioni delle correnti sono simili a quelle del modello ventricolare alla base, ma con opportuni adattamenti ai dati atriali umani: le variazioni introdotte portano ad una morfologia triangolare dell'AP, che non presenta più una fase di plateau. Lo schema delle correnti implementate è mostrato in figura 4.3A. Per ridurre il plateau, è stata sostituita la formulazione di  $I_{to}$  con quella del modello Maleckar et al. [76] e resa più ampia e, presa dallo stesso modello, è stata introdotta la corrente  $I_{Kur}$ .  $I_{K1}$  è stata ridotta al 15% per rendere più positivo il potenziale di riposo rispetto al caso ventricolare, mentre le correnti  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ , anche se inalterate, risultano comunque ridotte dalla nuova morfologia "spiky" del potenziale d'azione.  $I_{Na}$  non è stata oggetto di modifiche nella formulazione;  $I_{CaL}$  è stata di fatto aumentata nell'adattarla a registrazioni sperimentali; le intensità dello scambiatore sodio-calcio e della pompa sodio-potassio sono state entrambe ridotte del 30%. Inoltre, come il Koivumäki, il modello Grandi conserva le formulazioni per le correnti  $I_{bCa}$ ,  $I_{bNa}$  e per la pompa di calcio di sarcolemma, ma in contrasto, include una corrente di background di cloro  $I_{bCl}$ , una di cloro attivata dal calcio  $I_{ClCa}$  e una corrente di plateau di potassio  $I_{Kp}$ . Infine, prende in considerazione anche la concentrazione intracellulare di cloro (figura 4.3A).

La forma d'onda del potenziale d'azione generato dal modello Grandi è presentata in figura 4.2A: l'overshoot è poco pronunciato e la ripolarizzazione avviene in due fasi distinte, risultando in una maggiore durata dell'AP [138]. I parametri morfologici dell'AP sono riassunti in tabella 4.1.

Mentre l'upstroke del transiente di calcio riprodotto da Koivumäki et al. mostra

un andamento bifasico, coerente con il ritardo del rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  ad opera del reticolo sarcoplasmatico periferico e centrale, il modello Grandi non presenta la ritardata propagazione del segnale di  $\text{Ca}^{2+}$  verso l'interno della cellula, poiché non riscontrabile nelle acquisizioni sperimentali e per la dimostrata esistenza di una rete di tubuli T nei cardiomiociti atriali di mammifero [69]. La salita del transiente di  $\text{Ca}^{2+}$  risulta, anche nel modello Grandi, lenta, ma con un'ampiezza relativamente ridotta (figura 4.2B).



**Figura 4.2:** Potenziale d'azione (A) e transiente di calcio (B) del modello Grandi a 1 Hz.

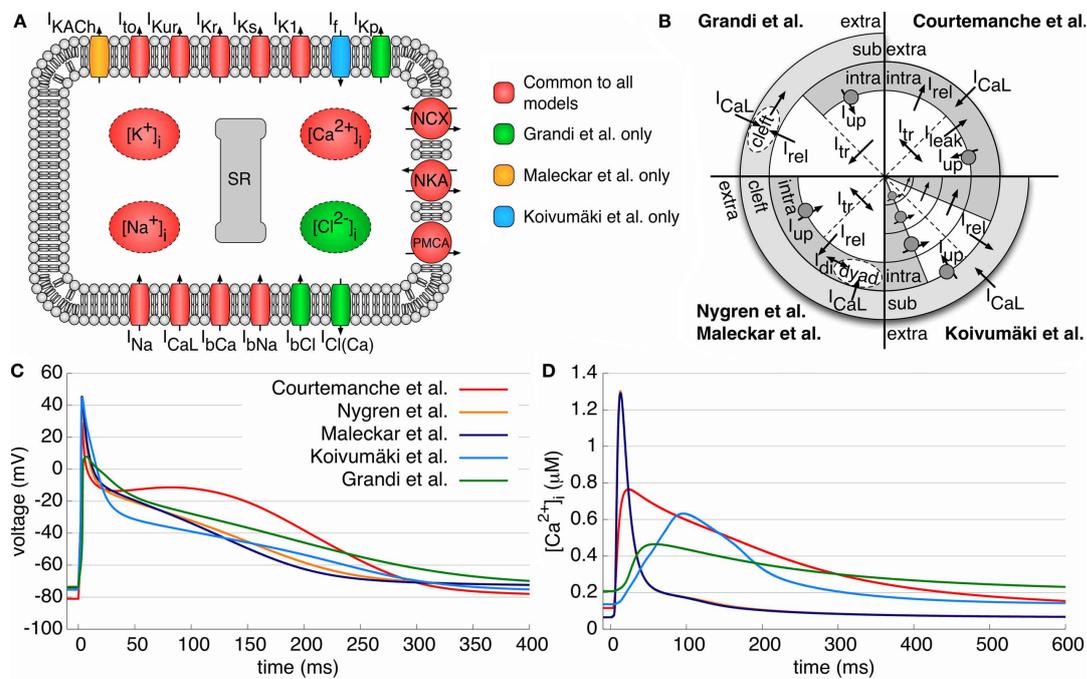
Il modello riproduce bene l'adattamento in frequenza della durata del potenziale d'azione e il minor adattamento nel caso di bloccaggio della corrente  $I_{\text{CaL}}$ . Gli autori identificano nella concentrazione  $[\text{Na}^+]_i$  un fattore determinante nell'adattamento in frequenza, rivelando come la variabilità delle curve di restituzione acquisite sperimentalmente sia imputabile alla valutazione dell'APD prima che tale ione abbia raggiunto una concentrazione di regime. L'adattamento in frequenza tende ad annullarsi nel caso in cui  $[\text{Na}^+]_i$  venga mantenuta costante durante la simulazione.

Infine, Grandi et al. hanno valutato l'impatto del blocco parziale della corrente  $I_{\text{Kur}}$  sull'APD e sul transiente di calcio, visto l'interesse clinico rivolto verso que-

sti canali ionici, praticamente esclusivi del tessuto atriale. La riduzione di  $I_{Kur}$  tende ad incrementare l'ampiezza del transiente di  $Ca^{2+}$  e la durata del potenziale d'azione.

### 4.1.3 Confronto

Quelli di Koivumäki et al. e di Grandi et al. sono i modelli di potenziale d'azione di cellula atriale non specializzata più aggiornati (2011) presenti in letteratura.



**Figura 4.3:** Figura tratta da Wilhelms et al. [138]: confronto tra i modelli Koivumäki e Grandi (insieme agli altri modelli atriali umani in letteratura [26, 76, 94]). Schematizzazione della cellula (A) e del  $Ca^{2+}$ -handling (B); potenziale d'azione (C) e transiente di calcio (D).

Essi hanno avuto un'origine e un'evoluzione diverse: il Koivumäki deriva dal modello Maleckar et al. che, a sua volta, è un aggiornamento del modello Nygren

et al.; il Grandi è derivato dal modello di cardiomiocita ventricolare pubblicato dal medesimo gruppo nel 2010. Per questo motivo, quest'ultimo modello risulta un valido strumento per identificare le principali differenze tra miociti atriali e ventricolari, in termini di correnti ioniche e conseguente AP.

I modelli condividono un ampio set di correnti (evidenziate in rosso in figura 4.3A) e si differenziano per la presenza della corrente funny in Koivumäki e di correnti di cloro (e, di conseguenza, anche del bilancio intracellulare di tale ione) e di una corrente di potassio detta di plateau in Grandi. I rispettivi potenziali d'azione sono messi a confronto in figura 4.3C, insieme a quelli dei modelli atriali meno recenti.

	KOIVUMÄKI	GRANDI
APD <sub>30</sub> (ms)	10.0	32.5
APD <sub>50</sub> (ms)	20.1	105.1
APD <sub>90</sub> (ms)	258.9	321.1
APA (mV)	123.9	88.3
RMP (mV)	-75.1	-73.5
OS (mV)	48.8	14.8
V <sub>max</sub> (V/s)	168.5	92.5
MDC (nM)	136	208
TA (nM)	496	257

**Tabella 4.1:** Parametri del potenziale d'azione e del transiente di calcio dei modelli Koivumäki e Grandi.

La fase 1 dell'AP è molto marcata nel modello Koivumäki rispetto al Grandi e ciò è confermato dai valori di APD<sub>30</sub> e, soprattutto, APD<sub>50</sub>; la differenza si riduce nell'APD<sub>90</sub>, ma resta comunque significativa, documentando una maggior durata del potenziale d'azione nel secondo modello (tabella 4.1). L'ampiezza dell'AP è circa 35 mV minore nel modello Grandi rispetto al Koivumäki: tale divergenza è dovuta sostanzialmente al ridotto overshoot, poiché il valore del potenziale di riposo è simile in entrambi (tabella 4.1). Ulteriore differenza si ha nella velocità

dell'upstroke in fase 0: i massimi valori sono uno circa il doppio dell'altro (tabella 4.1).

Entrambi i modelli si propongono di fornire, rispetto ai modelli precedenti, una descrizione più aggiornata della dinamica del calcio intracellulare: i valori della concentrazione diastolica e dell'ampiezza del transiente, anche se differiscono significativamente tra i due modelli, rispetto ai modelli meno recenti rientrano meglio nei range sperimentali (figura 4.3D e tabella 4.1). Per ottenere questi risultati, Koivumäki et al. e Grandi et al. partono da due ipotesi ben diverse: l'assenza o la presenza, nei cardiomiociti atriali, dei tubuli T. In termini modellistici, questo si traduce in due distinte strutturazioni del reparto intracellulare della cellula (figura 4.3B), che permettono di tenere o meno in considerazione effetti spaziotemporali nella diffusione del segnale  $[Ca^{2+}]_i$  verso l'interno: da un lato (modello Koivumäki) esso deve propagarsi in un tempo finito e lo fa attraversando quattro sottocompartimenti del bulk citosol; mentre dall'altro lato (modello Grandi) il valore di  $[Ca^{2+}]_i$  è istantaneo in tutto il bulk citosol (va ricordato, però, che entrambi modellano anche uno spazio di subsarcolemma con il quale effettivamente interagiscono i canali ionici). Infine, anche l'accoppiamento tra canali del calcio L-type e RyR è reso in maniera differente: nel modello Grandi questo è confinato in un sottospazio ristretto del subsarcolemma (cleft space), come rappresentato in figura 4.3B.

## 4.2 Sviluppo del modello SAN umano

La modellistica di potenziali d'azione cardiaci umani è stata ed è ampiamente studiata e utilizzata nella comprensione dei fenomeni alla base della generazione della forma d'onda dell'AP e dei meccanismi che conducono alle alterazioni proprie degli stati patologici. Se, ad oggi, la modellistica atriale umana ha raggiunto

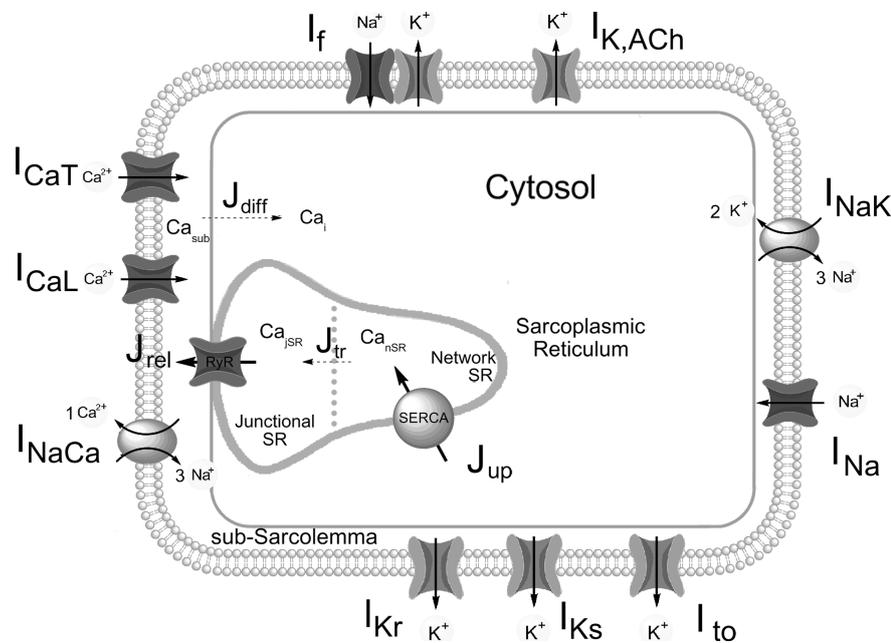
un ottimo livello di dettaglio nel contesto delle cellule non specializzate (come descritto nel paragrafo precedente), al contrario non esiste in letteratura un modello di potenziale d'azione di cellula atriale specializzata. Quello formulato da Chandler et al. [22] (paragrafo 2.2.1) non rappresenta un vero e proprio modello di AP di nodo senoatriale umano validato sui dati sperimentali esistenti (in particolare sui parametri morfologici [130]): esso è stato elaborato come strumento a conferma del fatto che il pattern di espressione genica dei geni responsabili per i principali canali ionici cardiaci, misurato dagli autori in cellule SAN umane, è congruente con la generazione di un potenziale d'azione oscillante, ma la cui forma non è in alcun modo ottenuta sulla base di dati elettrofisiologici provenienti da tali cellule. Per questi motivi, un obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di proporre il primo modello di potenziale d'azione di cellula di nodo senoatriale umana, basato sui dati sperimentali disponibili in letteratura. Nei paragrafi seguenti saranno illustrati gli step che hanno portato alla sua formulazione.

#### **4.2.1 Modello di partenza**

Il modello di potenziale d'azione di cellula SAN umana oggetto di questo lavoro non è stato formulato ex novo, ma si basa su un modello pubblicato preesistente. Molto spesso i nuovi modelli pubblicati sono versioni riviste ed aggiornate dei precedenti e, in molti casi, questo avviene nel passaggio sia da un tipo cellulare ad un altro (per esempio da modello di AP ventricolare ad atriale [43]), sia da una specie animale ad un'altra (per esempio da modello di AP ventricolare di coniglio ad umano [44]).

La scelta del modello di partenza è ricaduta su quello di Severi et al. [109] (*Severi*), in quanto è il più recente modello di potenziale d'azione di nodo senoatriale in letteratura. Esso è stato sviluppato allo scopo di riprodurre tutta una serie di dati relativi alla modulazione della frequenza ad opera della stimolazione autonoma,

dell'utilizzo di bloccanti specifici dei canali funny e delle variazioni nei transienti di calcio intracellulare. Ciò è stato raggiunto attraverso una revisione critica delle formulazioni delle correnti ioniche presenti in letteratura, favorendo, laddove possibile, un approccio di tipo specie-specifico (coniglio) nella selezione dei dati sperimentali ai quali attenersi per una maggiore consistenza del risultato finale. La figura 4.4 mostra la schematizzazione della compartimentazione intracellulare assunta nel modello Severi, insieme al set di correnti, pompe e scambiatori implementati.



**Figura 4.4:** Figura tratta da Severi et al. [109]: schematizzazione della cellula di nodo senoatriale di coniglio.

La struttura del sistema di gestione del calcio citosolico, che comprende il reticolo sarcoplasmatico (diviso in *Network SR* e *Junctional SR*), i flussi ad esso associati (uptake tramite la pompa SERCA, trasferimento da network a junctional SR, rilascio tramite canali RyR), lo spazio subsarcolemmale (all'interno del quale avviene il release dai canali RyR e si amplifica il segnale di  $\text{Ca}^{2+}$ ) e la diffusione da que-

sto al *cytosol* del calcio, è stata integralmente adottata dal modello di Maltsev e Lakatta [77], che ne hanno fornito la rappresentazione più dettagliata ed accurata.

#### 4.2.1.1 Corrente funny ( $I_f$ )

In accordo col modello di DiFrancesco e Noble [30], la corrente  $I_f$  è composta da due componenti indipendenti di sodio e di potassio di pari conduttanza ed è modulata dalla concentrazione  $[K^+]_o$ . È assunta una cinetica del secondo ordine, in cui la curva di (de)attivazione steady-state approssima i dati di Altomare et al. e Barbuti et al. [10, 14], mentre la costante di tempo è formulata come in Noble et al. [92].

#### 4.2.1.2 Corrente di calcio L-type ( $I_{CaL}$ )

Le proprietà conduttive dei canali della corrente  $I_{CaL}$  sono descritte secondo la *constant-field equation* formulata da Sarai et al. [106], che tiene in considerazione anche la non trascurabile permeabilità di questi canali al sodio e al potassio. La cinetica prevede un'attivazione e inattivazione voltaggio-dipendenti, le cui curve steady-state fittano i dati di Fermini e Nathan [39], mentre le costanti di tempo sono basate sui dati di Nilius [90] nel caso dell'attivazione e di Hagiwara et al., Kawano e Hiraoka e Nakayama et al. [47, 57, 84] nel caso dell'inattivazione; l'inattivazione dipende, inoltre, dalla concentrazione di calcio e l'espressione che la descrive è adottata dal modello Maltsev e Lakatta [77].

#### 4.2.1.3 Corrente di calcio T-type ( $I_{CaT}$ )

Come nel caso di  $I_{CaL}$ , anche la corrente  $I_{CaT}$  è formulata secondo la *constant-field equation* derivata da Sarai et al. [106] e le curve di attivazione e inattivazione steady-state e costante di tempo di attivazione sono basate sui dati di Fermini e

Nathan [39], mentre e la costante di tempo di inattivazione approssima i dati di Hagiwara et al. [47].

#### 4.2.1.4 Correnti rettificatrici di potassio ( $I_{Kr}$ , $I_{Ks}$ )

L'attivazione della corrente  $I_{Kr}$  è descritta dalla combinazione lineare di due variabili che condividono la stessa curva steady-state (basata sui dati di Lei e Brown [66]), ma evolvono con costanti di tempo diverse, una lenta e una veloce (derivate dai dati di Ono e Ito [99]). L'inattivazione è basata sui dati di Ono e Ito [99] per quanto riguarda la curva steady-state, mentre la costante di tempo è implementata come nel modello Maltsev e Lakatta [77].

La corrente  $I_{Ks}$  è stata formulata secondo una cinetica in cui la curva steady-state fitta i dati di Lei e Brown [66] e la costante di tempo è stata modificata al fine di riprodurre un esperimento di AP clamp di Lei et al. [67].

#### 4.2.1.5 Altre correnti ( $I_{Na}$ , $I_{to}$ , $I_{K,ACh}$ )

Le espressioni per le correnti  $I_{Na}$  e  $I_{to}$  sono adottate dai modelli Noble et al. [92] e Maltsev e Lakatta [77] rispettivamente. Il modello Severi implementa anche la corrente di potassio attivata dall'acetilcolina.  $I_{K,ACh}$  è formulata, come nel modello Sarai et al. [106], con variabili di gating voltaggio-dipendente e ACh-dipendente: quest'ultima è modificata in base ai dati di DiFrancesco e Tromba [31].

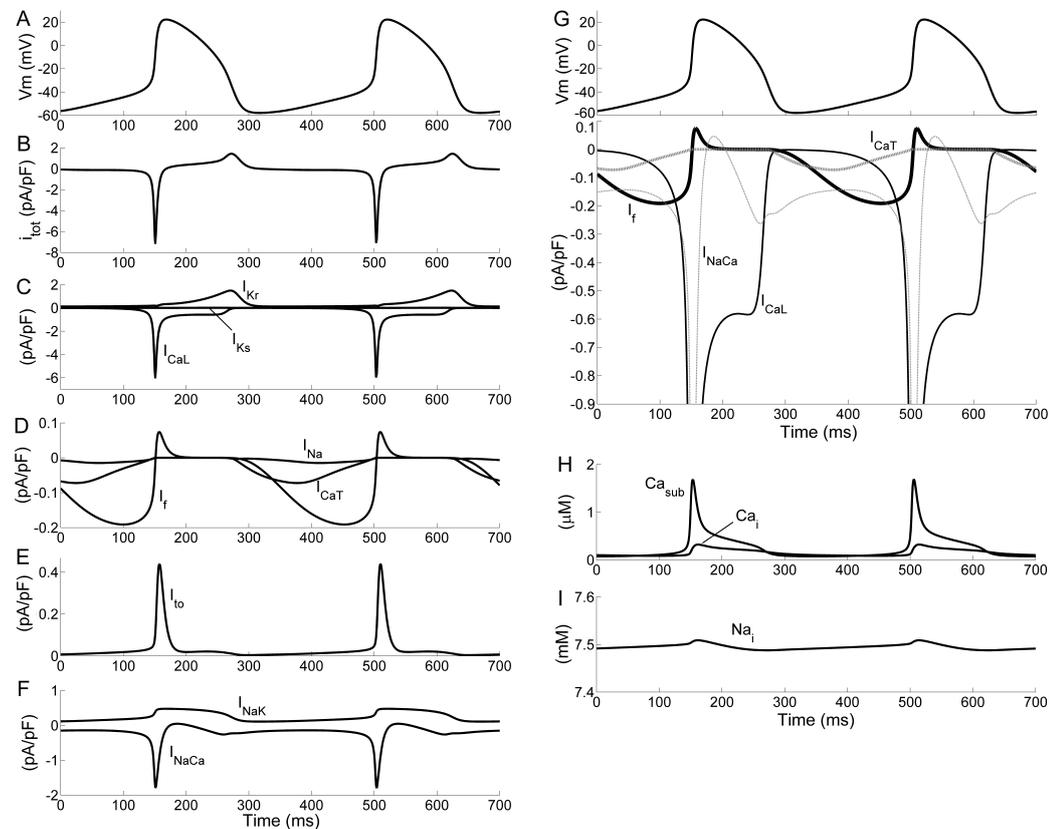
#### 4.2.1.6 Pompe e scambiatori ( $I_{NaK}$ , $I_{NaCa}$ )

La corrente  $I_{NaK}$ , generata dalla pompa sodio-potassio, è adottata dal modello Maltsev e Lakatta [77] con una modifica al termine dipendente dal voltaggio, apportata per far rientrare il valore di MDP del potenziale d'azione nel range riportato sperimentalmente.

La corrente  $I_{NaCa}$ , dovuta allo scambiatore sodio-calcio, è anch'essa adottata dal modello Maltsev e Lakatta [77], ma senza variazioni nella formulazione.

#### 4.2.1.7 Discussione

Forma d'onda e parametri del potenziale d'azione generato dal modello Severi sono presentati in figura 4.5A ed in tabella 4.2. Inoltre, le figure 4.5B-F e 4.5H-I mostrano le correnti e le concentrazioni ioniche sottostanti l'AP.



**Figura 4.5:** Figura tratta da Severi et al. [109]: potenziale d'azione del modello Severi e correnti e concentrazioni ioniche sottostanti.

Il modello Severi è stato validato su una grande quantità di dati sperimentali. Blocchi della corrente  $I_f$  ad opera di ivabradina ( $3\mu\text{M}$ ) e cesio ( $5\text{ mM}$ ) e stimolazione con acetilcolina ( $10\text{ nM}$ ) e isoprenalina ( $1\mu\text{M}$ ) sono riprodotti in maniera accurata

	SEVERI	VALORI SPERIMENTALI	
		media±SD	range
CL (ms)	352	325±42	247÷389
MDP (mV)	-58	-56±6	-66÷-52
APA (mV)	80	87±6	78÷98
OS (mV)	22	27±5	20÷32
APD <sub>50</sub> (ms)	108	93±12	73÷111
V <sub>max</sub> (V/s)	7.1	11.3±6.5	4.8÷27

**Tabella 4.2:** Dati tratti da Severi et al. [109]: parametri del potenziale d'azione di cellula di nodo senoatriale di coniglio.

e molto consistente con i risultati sperimentali (si veda il paper [109] per il dettaglio dei metodi e dei risultati) ed evidenziano il ruolo predominante della corrente funny nella regolazione della frequenza cardiaca. Per valutare se tale ruolo fosse dipendente dalla particolare formulazione di  $I_f$  adottata, gli autori hanno eseguito simulazioni sostituendo l'espressione di  $I_f$  con quella di altri modelli, ottenendo, come risultato, ancora una forte sensibilità del modello alla modulazione di tale corrente.

Questa conclusione non esclude in alcun modo (né effettivamente supporta) il fatto che variazioni nei transienti di calcio intracellulare possano influenzare la frequenza cardiaca. Infatti, il modello Severi riproduce anche esperimenti nei quali sono coinvolti i meccanismi di gestione del calcio, come l'effetto chelante di 10 mM di BAPTA (che determina un rallentamento della frequenza), simulazioni della modulazione dell'intensità dello scambiatore sodio-calcio o dell'uptake tramite la pompa SERCA (che modificano la frequenza, ma alterano notevolmente la morfologia del potenziale d'azione soprattutto in fase diastolica) oppure la capacità del modello di generare oscillazioni di  $Ca^{2+}$  non triggerate dalla depolarizzazione del potenziale di membrana (clampaggio del potenziale al valore di MDP).

In conclusione, il Severi et al. si propone come modello di potenziale d'azione di cellula di nodo senoatriale (di coniglio) più aggiornato e capace di riprodurre un ampio set di risultati sperimentali rilevanti nella generazione e nel controllo dell'attività pacemaker, che i precedenti modelli in letteratura non riproducono.

## 4.2.2 Modifiche apportate

Il primo modello di potenziale d'azione pacemaker umano è stato sviluppato a partire dal modello Severi sopra descritto, incorporandovi tutta la "conoscenza" disponibile ad oggi in letteratura sul nodo senoatriale umano (capitolo 2).

### 4.2.2.1 Corrente $I_f$

Verkerk et al. hanno riportato, per la corrente  $I_f$  registrata su cellule SAN umane, una conduttanza massima  $g_f$  di 75 pS/pF e un potenziale di inversione  $E_f$  di -22 mV, avendo caratterizzato la corrente secondo la formula (2.1) [125, 130] (paragrafo 2.3). Considerando, nel modello Severi, una capacità equivalente di 32 pF, si ottiene  $g_f = 2.4 \cdot 10^{-3} \mu S$  e, scegliendo di mantenere il termine di modulazione della conduttanza da parte della concentrazione extracellulare di potassio, si può scrivere

$$g_f = 2.4 \cdot 10^{-3} = \bar{g}_f \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + 45} \quad (4.1)$$

da cui, poiché  $[K^+]_o$  è posta al valore 5.4 mM, si ricava l'effettivo valore della conduttanza della corrente  $I_f$  da utilizzare nel modello, ovvero

$$\bar{g}_f = 0.0224 \mu S \quad (4.2)$$

In accordo con la recente review di Verkerk e Wilders [129] sui modelli di corrente funny, è stato scelto di implementare  $I_f$  divisa nelle sue due componenti di sodio e potassio, ma con un rapporto  $g_{fNa}/g_{fK}$  non unitario come invece risulta nel modello Severi. Seguendo l'approccio suggerito da Verkerk e Wilders, è stato calcolato

tale rapporto, chiamato  $\alpha$ , impostando la combinazione lineare seguente:

$$g_f \cdot (V_m - E_f) = g_{fNa} \cdot (V_m - E_{Na}) + g_{fK} \cdot (V_m - E_K) \quad (4.3)$$

in cui  $g_f$  può essere scritta come somma di  $g_{fNa}$  e  $g_{fK}$  e, a sua volta,  $g_{fNa}$  può essere scritta come  $\alpha \cdot g_{fK}$ . Ne risulta l'equazione nell'unica incognita  $\alpha$

$$E_f = \frac{\alpha \cdot E_{Na} + E_K}{\alpha + 1} \quad (4.4)$$

dove il valore  $E_f$  è quello calcolato sperimentalmente (-22 mV) e i potenziali di Nernst di sodio e potassio si ricavano dai valori delle concentrazioni ioniche utilizzate nello stesso esperimento.

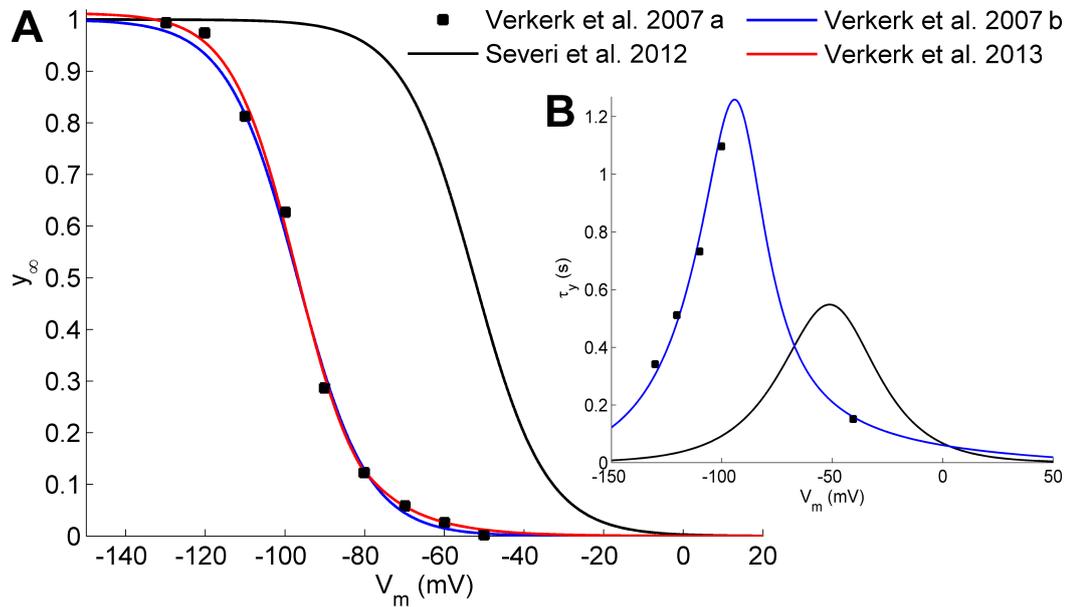
Servendosi, dunque, dei dati di Verkerk et al. [130], è stato ottenuto un valore di  $\alpha$  pari a 0.5927 e, facendo valere il sistema di equazioni

$$\begin{cases} \bar{g}_{fNa} = \alpha \cdot \bar{g}_{fK} \\ \bar{g}_{fNa} + \bar{g}_{fK} = \bar{g}_f \end{cases} \quad (4.5)$$

sono stati infine calcolati i valori di conduttanza delle due componenti della corrente  $I_f$ :

$$\begin{aligned} \bar{g}_{fNa} &= 8.931 \cdot 10^{-4} \mu S \\ \bar{g}_{fK} &= 1.507 \cdot 10^{-3} \mu S \end{aligned} \quad (4.6)$$

Per quanto riguarda la cinetica di (de)attivazione, è stato deciso di assumerla al primo ordine (quindi non al secondo ordine come nel modello Severi) e di descriverla tramite le formulazioni presentate da Verkerk et al. [125, 126]. La scelta di adottare una cinetica del primo ordine dipende dal fatto che la curva steady-state riportata da Verkerk et al. è una sigmoide semplice fittata sui propri dati sperimentali, al contrario, nel modello Severi, i punti della sigmoide utilizzata nel fitting dei dati sono elevati al quadrato. Come già visto nel capitolo 2, Verkerk et al. riportano due formulazioni per la curva steady-state [125, 126], delle quali la seconda è una "correzione" della prima: il confronto tra le due versioni, (2.5) e (2.12), è mostrato in figura 4.6A.



**Figura 4.6:** Curva di (de)attivazione steady-state di  $I_f$ ,  $y_\infty$  (A) e relativa costante di tempo (B): confronto tra i dati [130] e le formulazioni proposte da Verkerk et al. [125, 126] e del modello Severi et al. [109].

La (2.12) fitta in modo migliore i punti sperimentali, in particolare quelli ai potenziali diastolici. Per questo motivo è stata scelta questa equazione. La costante di tempo di (de)attivazione è stata invece implementata secondo le equazioni (2.8)-(2.10) [125] descritte nel capitolo 2 (figura 4.6B).

La formulazione finale per la nuova corrente  $I_f$  inserita nel modello Severi risulta:

$$\begin{aligned}
 I_{fNa} &= \bar{g}_{fNa} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + 45} \cdot y \cdot (V_m - E_{Na}) \\
 I_{fK} &= \bar{g}_{fK} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + 45} \cdot y \cdot (V_m - E_K)
 \end{aligned}
 \tag{4.7}$$

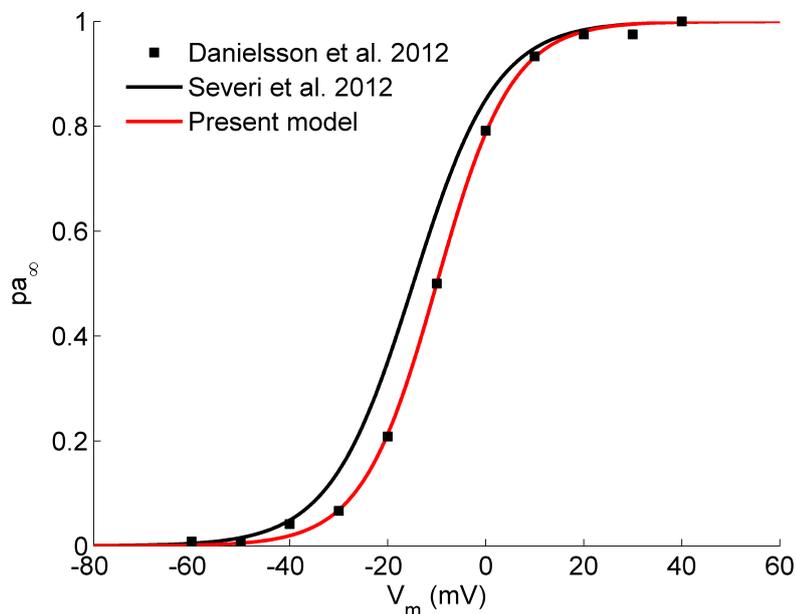
#### 4.2.2.2 Corrente $I_{Kr}$

$I_{Kr}$  è stata aggiornata secondo quanto riportato da Danielsson et al. su campioni di tessuto nodale umano ottenuto da cuori embrionali [28]. I dati dell'attivazione della corrente  $I_{Kr}$  sono stati normalizzati rispetto al massimo valore misurato

dagli autori e poi fittati con la sigmoide

$$pa_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-(V_m + 10.0144)}{7.6607}}} \quad (4.8)$$

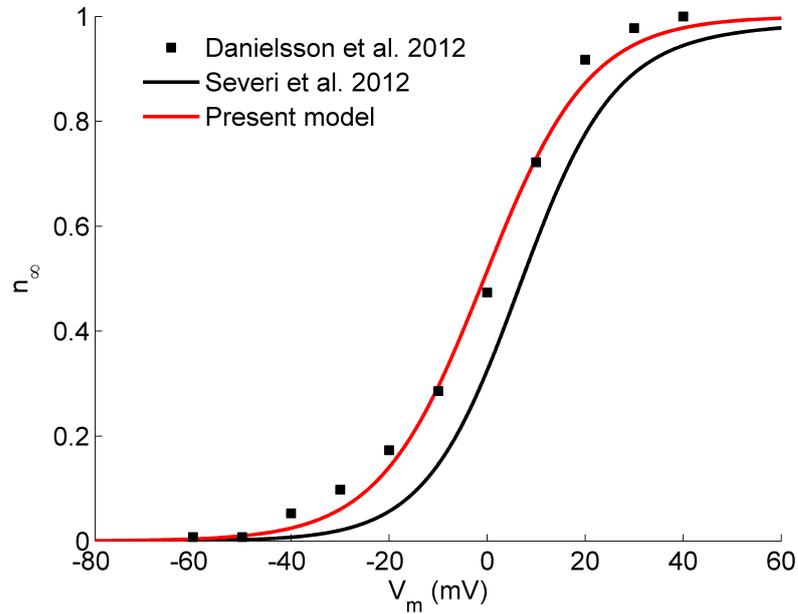
Il risultato è presentato in figura 4.7. Infine, il valore della conduttanza  $g_{Kr}$  è stato aggiustato a  $0.00238 \mu\text{S}$  (+10% rispetto al valore originale del modello Severi) per rendere più negativo il valore di MDP e portarlo entro il range sperimentale.



**Figura 4.7:** Curva di attivazione steady-state di  $I_{Kr}$ ,  $pa_{\infty}$ : confronto tra il fitting dei dati di Danielsson et al. [28] e la formulazione del modello Severi et al. [109].

#### 4.2.2.3 Corrente $I_{Ks}$

Allo stesso modo di  $I_{Kr}$ , anche la corrente  $I_{Ks}$  è stata aggiornata con la curva steady-state di attivazione ottenuta fittando i dati di Danielsson et al. [28] normalizzati (figura 4.8). In questo caso, però, non è stato modificato il valore della conduttanza massima.



**Figura 4.8:** Curva di attivazione steady-state di  $I_{Ks}$ ,  $n_{\infty}$ : confronto tra il fitting dei dati di Danielsson et al. [28] e la formulazione del modello Severi et al. [109].

#### 4.2.2.4 Corrente $I_{Kur}$

Il lavoro di Chandler et al. sul pattern di espressione genica dei canali ionici su preparati di tessuto cardiaco atriale umano [22], rivela la presenza, nelle cellule del nodo senoatriale, dei canali  $K_v1.5$  responsabili della corrente ultra rapida di potassio  $I_{Kur}$ . Il modello Severi non implementa tale corrente: si è deciso di introdurla principalmente per controllare i valori di durata del potenziale d'azione (altrimenti troppo elevati) nella fase iniziale della ripolarizzazione e per bilanciare l'aumento del valore di overshoot dell'AP dovuto alla modifica della corrente di calcio L-type (si veda il paragrafo successivo).

La formulazione per  $I_{Kur}$  è stata adottata dal più recente modello di potenziale d'azione atriale, Grandi et al. [43] e deriva in origine dal modello Maleckar et al. [76]. Le equazioni che la descrivono sono le seguenti:

$$I_{Kur} = g_{Kur} \cdot r \cdot s \cdot (V_m - E_K) \quad (4.9)$$

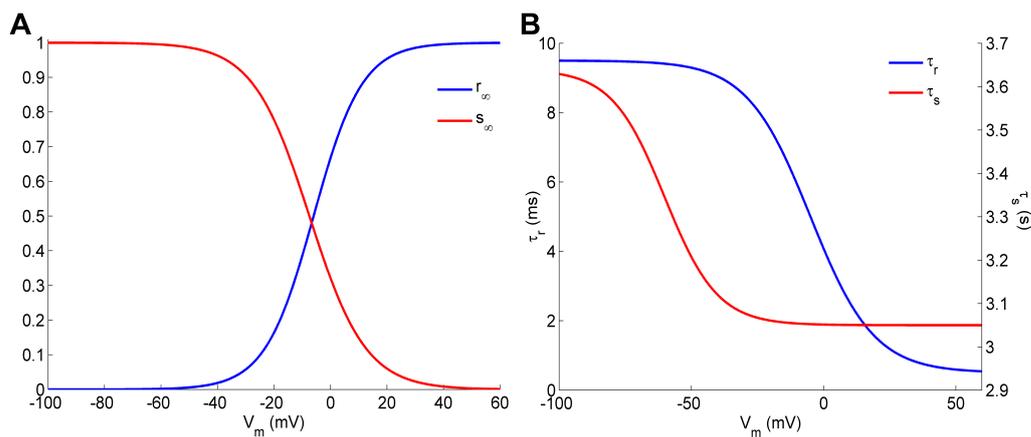
$$r_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m + 6}{-8.6}}} \quad (4.10)$$

$$\tau_r = \frac{0.009}{1 + e^{\frac{V_m + 5}{12}}} + 0.0005 \quad (4.11)$$

$$s_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m + 7.5}{10}}} \quad (4.12)$$

$$\tau_s = \frac{0.59}{1 + e^{\frac{V_m + 60}{12}}} + 3.05 \quad (4.13)$$

Il valore della conduttanza è stato posto pari a  $0.000127 \mu\text{S}$ , che corrisponde a circa il 9% del valore originario della stessa nel modello Grandi et al.: tale riduzione è in linea con quanto riportato da Chandler et al. a proposito delle differenze nei livelli di espressione dei geni codificanti per questi canali tra tessuto atriale e del nodo del seno, anche se gli autori indicano nello specifico un 74% di riduzione [22]. Le curve steady-state di attivazione e inattivazione e le rispettive costanti di tempo sono mostrate nelle figure 4.9A e 4.9B.



**Figura 4.9:** A, curve di attivazione ( $r_{\infty}$ ) e inattivazione ( $s_{\infty}$ ) steady-state di  $I_{Kur}$ ; B, relative costanti di tempo.

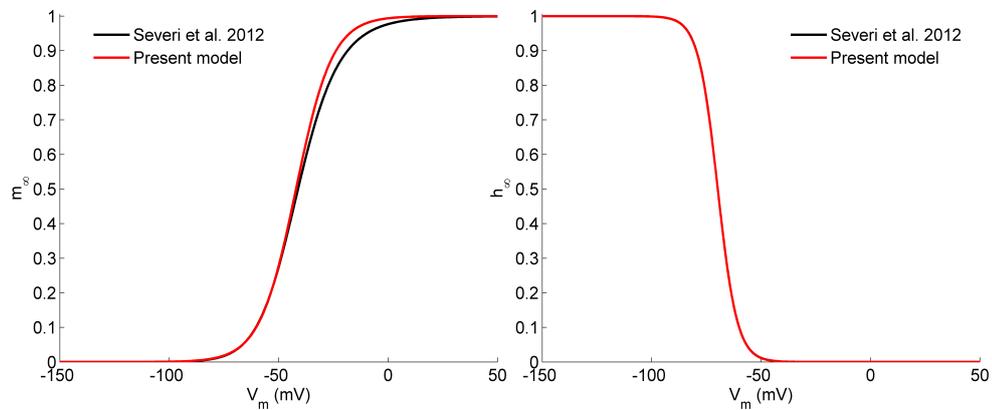
#### 4.2.2.5 Transiente di $[Ca^{2+}]_i$

Secondo Verkerk et al., il transiente di calcio intracellulare misurato in cellule SAN umane ha ampiezza di circa 110 nM, compreso tra una concentrazione diastolica pari a 110 nM e un picco massimo di 220 nM [126]. Nel modello Severi  $[Ca^{2+}]_i$  varia nel range 85-320 nM che, dopo l'aggiornamento delle correnti  $I_f$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  (paragrafi precedenti), diventa 17-250 nM. Per riprodurre il dato di Verkerk et al., come primo step, è stata ridotta la corrente massima dello scambiatore sodio-calcio del 75% (da 4 a 1 nA), nel tentativo di alzare il livello di  $Ca^{2+}$  diastolico, in quanto una minore intensità di  $I_{NaCa}$  determina una ridotta estrusione di calcio dalla cellula. In seguito sono stati modificati alcuni parametri delle equazioni del rilascio e riassorbimento del calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico, in modo da contribuire a correggere il transiente di  $[Ca^{2+}]_i$ , ma mantenendo, allo stesso tempo, un livello di calcio reticolare nell'ordine del millimolare e un adeguato picco nel rilascio tramite i canali RyR (centinaia di mM/s). Per quanto riguarda il flusso di release, i parametri modificati sono l'intensità massima  $k_s = 150000000 \text{ s}^{-1}$  (-40%) e il rateo di transizione dallo stato *open* (O) a quello *resting* (R) dei canali RyR  $k_{om} = 660 \text{ s}^{-1}$  (+1000%); mentre per quanto riguarda il flusso di uptake, i parametri modificati sono l'intensità massima  $P_{up} = 48 \text{ mM/s}$  (+300%) ed il valore di metà massima intensità (dell'equazione di Hill)  $k_{up} = 0.006 \text{ mM}$  (+900%). Sia per il rilascio che per l'assorbimento di calcio, le modifiche alla coppia di parametri vanno in direzioni opposte e, in parte, si compensano tra loro: nel primo caso si riduce l'intensità massima, ma si aumenta il rateo di transizione verso lo stato resting dei canali e questo di fatto favorisce il ritorno allo stato aperto (in quanto il rateo  $R \rightarrow O$  prevale sugli altri); nel secondo caso viene aumentata l'attività massima, ma è aumentata anche la concentrazione di calcio richiesta per raggiungere metà del valore di massima intensità. In entrambi i casi, comunque, il bilancio che ne deriva è più spostato verso un'aumento dell'attività risultante.

Infine, per sintonizzare al meglio il transiente di  $[Ca^{2+}]_i$ , è stata aumentata del 10.5% la permeabilità massima della corrente  $I_{CaL}$ , portandola da 0.2 a 0.221  $\mu S$  (questo è servito, al contempo, ad aggiustare il valore di  $V_{max}$  del potenziale d'azione entro il range sperimentale); è stata leggermente rallentata la diffusione del calcio dal compartimento subsarcolemmale a quello citosolico ( $\tau_{diffCa} = 4.2 \cdot 10^{-5}$  s, ovvero +5% del valore originario); sono state variate le costanti di associazione per la calmodulina e la calsequestrina che influiscono sul buffering di  $Ca^{2+}$ , in particolare  $kf_{CM} = 2277000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (+900%) e  $kf_{CQ} = 150 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (-71.9%), delle quali la prima entra in gioco nel bilancio di  $[Ca^{2+}]_i$  e la seconda in quello di  $[Ca^{2+}]_{jSR}$  (concentrazione di calcio nel junctional SR).

#### 4.2.2.6 Aggiustamenti minori

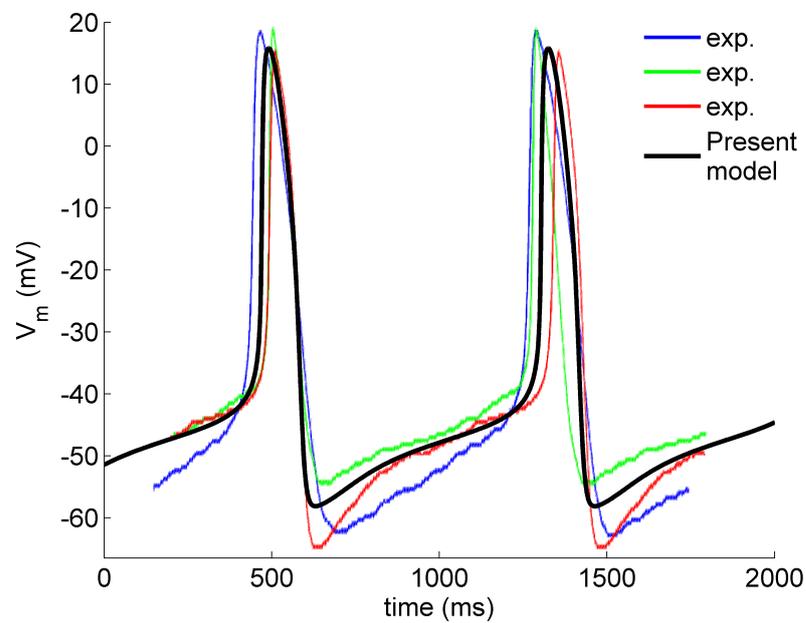
Tra gli aggiustamenti minori, vi è la riduzione del 42.5% del valore di massima permeabilità della corrente  $I_{CaT}$  ( $P_{CaT} = 0.0115 \mu S$ ), necessaria per ottenere una morfologia più lineare nella fase di depolarizzazione diastolica del potenziale d'azione; inoltre vi è la riscrittura delle variabili di gating di attivazione ( $m_\infty$ ) e inattivazione ( $h_\infty$ ) della corrente  $I_{Na}$  (la cui presenza nel SAN è accertata da Verkerk et al. [131]), tramite equazioni sigmoidali (queste erano nella forma descritta dai ratei  $\alpha$  e  $\beta$ , derivante dal modello Noble et al. [92] e non pratica nel caso di variazione della pendenza). La curva  $h_\infty$  risulta esattamente sovrapposta a quella originale del modello Severi (figura 4.10B), in quanto i termini  $\alpha_h$  e  $\beta_h$  erano simmetrici rispetto allo stesso valore del potenziale di membrana; ciò non accadeva per la curva  $m_\infty$ , per cui si è scelto di sovrapporre la nuova sigmoide in modo corretto ai potenziali rilevanti per questa corrente (figura 4.10A): l'adozione delle due nuove espressioni non altera minimamente il potenziale d'azione, confermando la validità della scelta fatta per  $m_\infty$ .



**Figura 4.10:** Curve steady-state di attivazione  $m_\infty$  (A) e di inattivazione  $h_\infty$  (B) di  $I_{Na}$ .

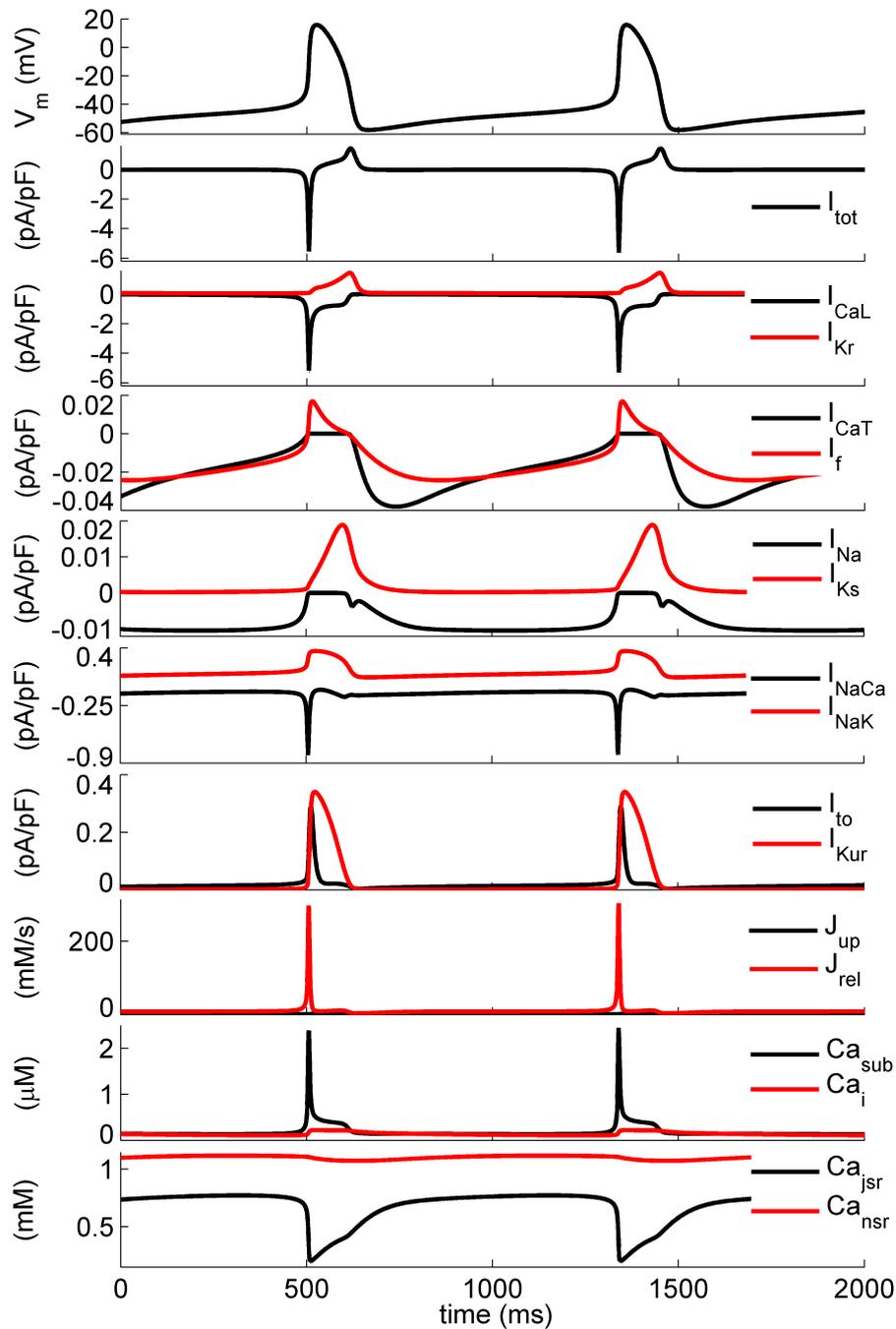
### 4.2.3 Risultato

Il modello così ottenuto genera un potenziale d'azione la cui forma d'onda è confrontata in figura 4.11 con i tracciati sperimentalmente registrati [125, 127, 128, 130].



**Figura 4.11:** Potenziale d'azione generato dal presente modello a confronto con i tracciati sperimentali [125, 127, 128, 130].

La figura 4.12 mostra gli andamenti temporali delle correnti ioniche di membrana



**Figura 4.12:** Potenziale d'azione generato dal presente modello e correnti, flussi e concentrazioni ioniche sottostanti.

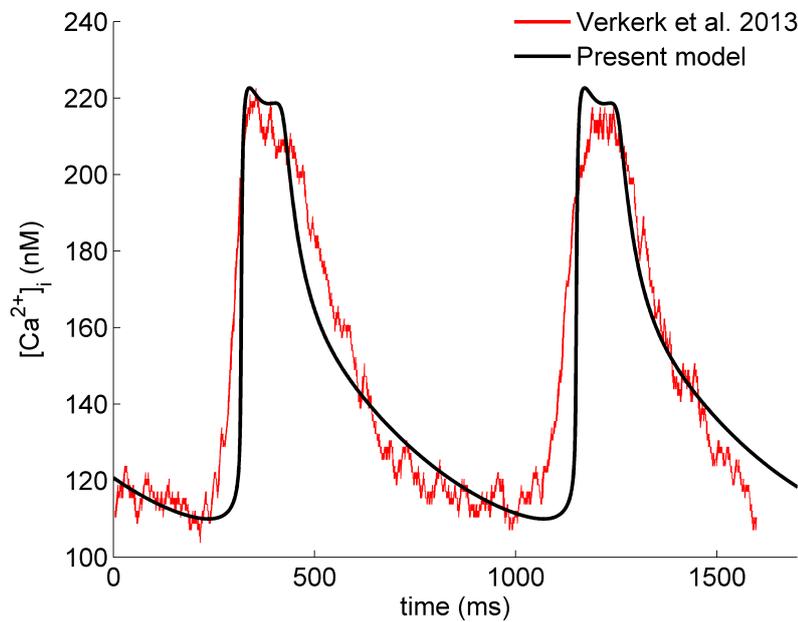
normalizzate rispetto al valore della capacità equivalente  $C_m$  ( $I_{tot}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{CaT}$ ,  $I_f$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{NaCa}$ ,  $I_{NaK}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ), dei flussi ionici che interessano il reticolo sarcoplasmatico ( $J_{up}$ ,  $J_{rel}$ ) e delle concentrazioni di calcio nei diversi compartimenti intracellulari ( $Ca_{sub}$ ,  $Ca_i$ ,  $Ca_{jst}$ ,  $Ca_{nsr}$ ) sottostanti il potenziale d'azione.

Il presente modello riproduce molto fedelmente gli AP sperimentali acquisiti da cellule di nodo senoatriale umano e ciò è confermato dal fatto che i parametri descrittivi della morfologia concordano molto bene con quelli riportati in letteratura, come è visibile in tabella 4.3 (tutti i parametri sono misurati dopo il raggiungimento di condizioni di regime nel modello).

	PRESENTE MODELLO	DATI SPERIMENTALI
CL (ms)	833.0	828±15
APD <sub>20</sub> (ms)	80.0	64.9±16.9
APD <sub>50</sub> (ms)	112.3	101.5±27.0
APD <sub>90</sub> (ms)	137.0	143.5±34.9
APA (mV)	74.0	78.0±4.5
MDP (mV)	-58.1	-61.7±4.3
OS (mV)	15.9	16.4±0.7
DDR <sub>100</sub> (mV/s)	31.6	48.9±18
$V_{max}$ (V/s)	5.5	4.6±1.2
$[Ca^{2+}]_i$	110 – 223	110 – 220

**Tabella 4.3:** Parametri del potenziale d'azione generato dal presente modello a confronto con i range sperimentali [126, 130].

Infine, le modifiche apportate al sistema del calcium-handling permettono di ottenere transienti di calcio intracellulare in ottimo accordo con le registrazioni sperimentali. In figura 4.12 il tracciato di  $Ca_i$  risulta non ben visibile per via della maggior ampiezza di  $Ca_{sub}$ , per cui è stato riportato separatamente in figura 4.13 e messo a confronto con quello ottenuto da Verkerk et al. [126].



**Figura 4.13:** Transiente di calcio intracellulare generato dal presente modello a confronto con il tracciato sperimentale [126].

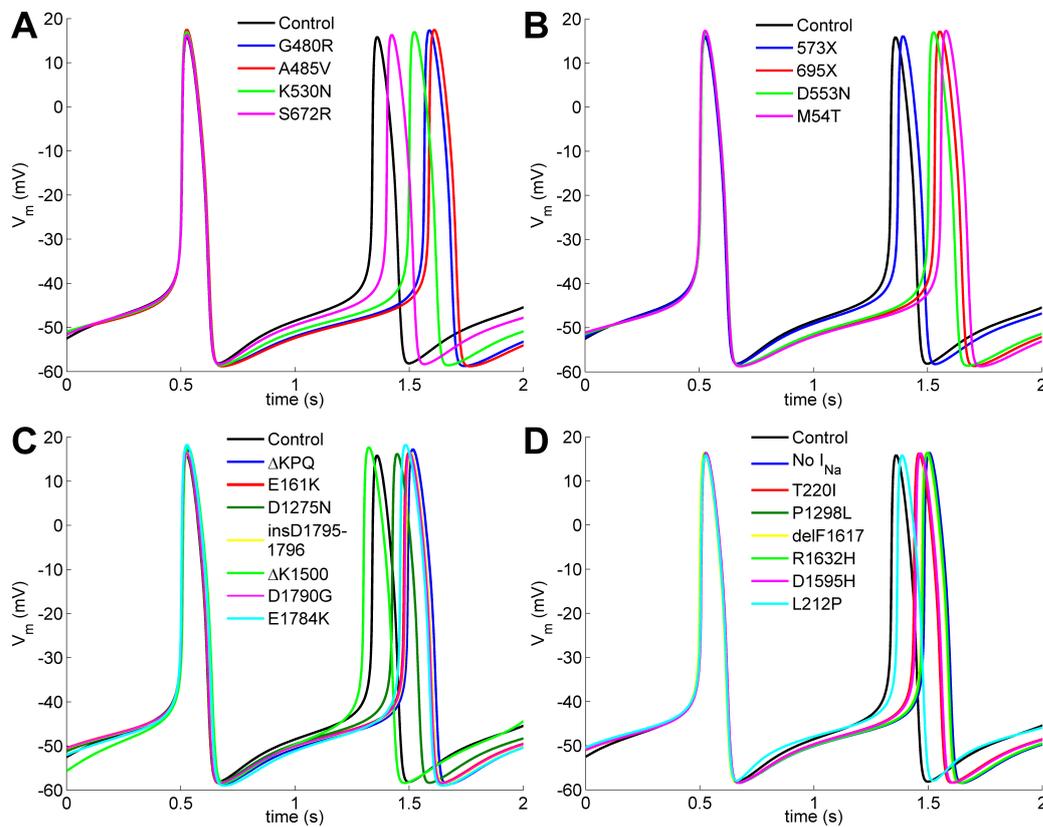
#### 4.2.4 Validazione

La validazione del modello di potenziale d'azione SAN umano sviluppato può essere condotta soltanto in relazione a quanto permesso dai dati sperimentali umani disponibili. Per via della propria completezza, i dati sperimentali utilizzati nella validazione della morfologia dell'AP provengono dai lavori di Verkerk et al. [127, 128, 130], ma, nel confronto con i dati ottenuti da Drouin et al. [35] (tabella 2.3), i parametri caratteristici dell'AP sono comunque paragonabili (escluso il dato di CL, probabilmente condizionato da un rimodellamento elettrico in seguito alla patologia del paziente da cui sono stati estratti i campioni di tessuto per le misurazioni).

Ulteriore validazione della frequenza cardiaca simulata dal presente modello è ottenibile tramite il confronto con i dati ricavati in vivo mediante metodi non invasivi e in condizioni fisio-patologiche. Un esempio è rappresentato dai casi di aritmie

cardiache riscontrate in presenza di mutazioni genetiche dei canali ionici: tutte le mutazioni descritte nel capitolo 3 sono state simulate nel presente modello. Per quanto riguarda la corrente  $I_f$ , sono stati applicati gli effetti elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2, preferendo quelli dovuti ai casi di eterozigosi tra subunità HCN4 wild-type e mutate (più vicini alle condizioni in vivo rispetto ai casi di omozigosi). Gli effetti consistono in shift e variazioni di pendenza della curva di (de)attivazione steady-state, in riduzioni della conduttanza massima della corrente e in variazioni della costante di tempo. Dato che  $\tau_f$  ha un andamento tipico a "campana" (figura 4.6B), in cui il potenziale di picco separa circa le fasi di attivazione (a sinistra) e deattivazione (a destra), è stato deciso di implementare le variazioni nella costante di tempo applicando, ove occorra, lo stesso shift della curva steady-state: in tal modo, per esempio, uno shift iperpolarizzante nella formulazione di  $\tau_f$  ne aumenta i valori della fase di attivazione e ne diminuisce quelli della fase di deattivazione. Nei casi 695X, D553N e M54T, nei quali non sono riportati shift significativi della curva steady-state, le variazioni della costante di tempo sono state comunque applicate nel modo sopra descritto, stimandole in shift di +5, +10 e -5 mV rispettivamente. I potenziali d'azione risultanti sono presentati nelle figure 4.14A e 4.14B, mentre i valori delle variazioni di frequenza sono elencati in tabella 4.4. Considerando una frequenza basale di 72 bpm (CL= 833 ms), il modello riproduce una consistente riduzione della frequenza cardiaca per la maggior parte delle mutazioni di  $I_f$  simulate, con alcune eccezioni (per esempio S672R e 573X) in cui l'effetto è comunque presente, ma meno pronunciato. Il meccanismo alla base delle variazioni di frequenza è la riduzione della corrente funny, principalmente ad opera degli shift iperpolarizzanti della curva di (de)attivazione che agiscono diminuendo la disponibilità di corrente, oppure ad opera della diretta riduzione della sua intensità massima. Nei due casi che fanno eccezione, la riduzione di frequenza è contenuta per via della minore entità dello shift negativo (S672R, tabella

3.1) o della presenza di uno shift positivo che contrasta l'irripidimento della curva steady-state (573X, tabella 3.2).



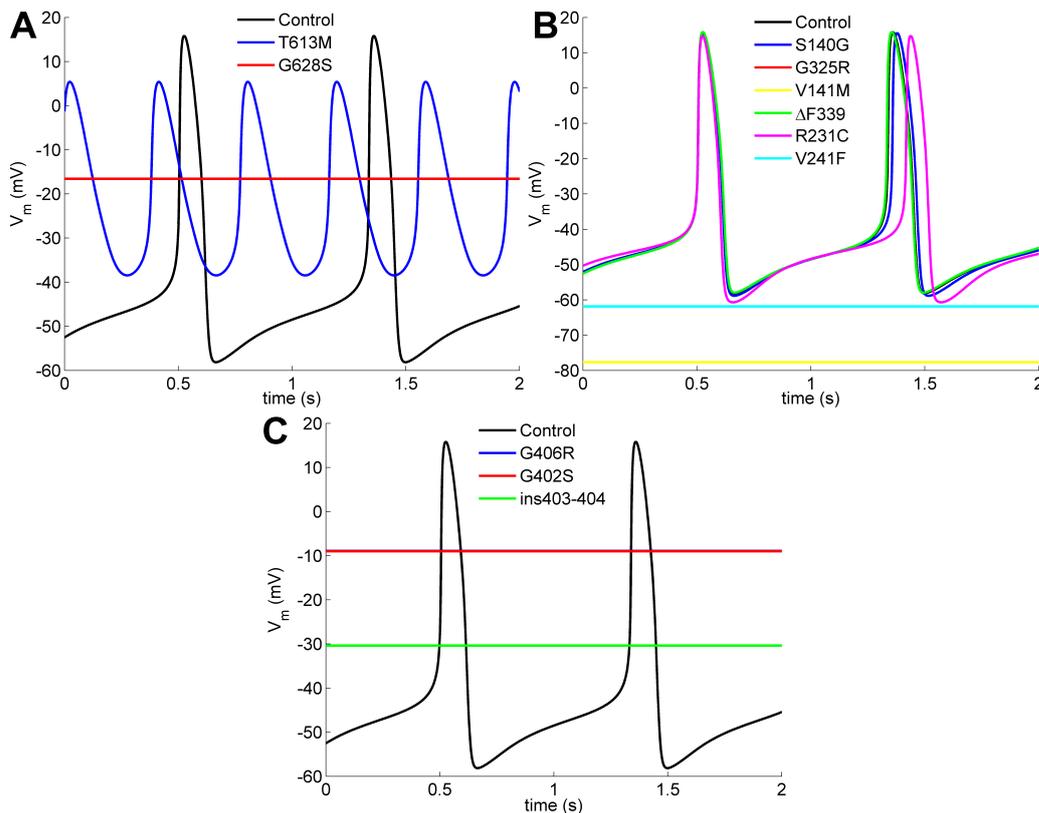
**Figura 4.14:** Simulazioni delle mutazioni geniche dei canali della corrente  $I_f$  (A e B) e  $I_{Na}$  (C e D). "No  $I_{Na}$ " si riferisce alle mutazioni G1408R, R1623X, T187I, K1578fs/52 e W1421X caratterizzate da completa perdita di funzione.

Gli effetti delle mutazioni dei canali ionici della corrente  $I_{Na}$  simulati nel presente modello sono quelli raccolti nelle tabelle 3.3-3.7. Nei casi in cui più autori riportano effetti diversi per la stessa mutazione, sono stati scelti quelli riscontrati in presenza di bradicardia sinusale (ove espressamente indicata); nei casi, invece, delle mutazioni che inducono una corrente persistente di sodio, sono stati scelti gli effetti corrispondenti alla minor intensità della  $I_{Na}$  late riscontrata (si veda la discussione più avanti). Tale corrente late (assente nel presente modello) è sta-

ta formulata come una componente di  $I_{Na}$  non inattivante e di massima intensità corrispondente ad una frazione di  $g_{Na}$  pari alla percentuale sul picco misurate negli esperimenti. Inoltre, contrariamente a quanto fatto per  $I_f$ , le variazioni delle costanti di tempo relative alle cinetiche di  $I_{Na}$  sono state implementate tramite un fattore moltiplicativo costante. Nelle figure 4.14C e 4.14D sono visibili i potenziali d'azione simulati (in figura 4.14D gli AP delle mutazioni P1298L, delF1617 e R1632H risultano sovrapposti) e gli effetti sulla frequenza sono mostrati in tabella 4.4. Nei casi in cui il confronto con i riferimenti sperimentali numerici è possibile, si può dire che i risultati ottenuti dal presente modello siano in buon accordo con essi, eccettuato il singolo caso della mutazione  $\Delta K1500$ . A tal proposito, se si osserva la figura 3A dell'articolo di Grant et al. [45] (gli autori che hanno caratterizzato questa mutazione), si può notare che il fitting da loro proposto per la curva di inattivazione della corrente  $I_{Na}$  non è attendibile per potenziali superiori a -80 mV (ovvero quelli rilevanti nell'AP del presente modello) e risulta sovrastimare la disponibilità di corrente a tali potenziali. Dalla simulazione, infatti, si deduce che la causa dell'aumento di frequenza nel caso mutato sia proprio la variazione di slope della curva di inattivazione indicata dagli autori. Nei restanti casi, dove la patologia (bradicardia sinusale) non è quantificata in termini di valore della frequenza cardiaca, il modello riproduce una consistente riduzione di frequenza tranne che per la mutazione L212P, la quale si differenzia da tutte le precedenti per il segno negativo dello shift nella curva di attivazione di  $I_{Na}$  (tabella 3.7), che risulta responsabile del minor effetto sulla frequenza.

In figura 4.15A e in tabella 4.4 sono presentati i risultati delle simulazioni delle mutazioni relative alla corrente  $I_{Kr}$ , secondo gli effetti dei casi eterozigoti elencati in tabella 3.8. La perdita di funzionalità di questi canali data dalle mutazioni, impedisce la ripolarizzazione del potenziale d'azione, che si assesta su un valore costante se la perdita di funzionalità è totale (G628S) oppure, se la funzione

non è completamente persa (T613M), conserva delle oscillazioni ad alta frequenza, innescate principalmente dalla corrente  $I_{CaL}$  che risulta sempre attiva a questi potenziali depolarizzati. Per quanto riguarda la corrente  $I_{Ks}$ , tra gli effetti indotti



**Figura 4.15:** Simulazioni delle mutazioni geniche dei canali della corrente  $I_{Kr}$  (A),  $I_{Ks}$  (B) e  $I_{CaL}$  (C).

dalle mutazioni, elencati nelle tabelle 3.9-3.11, sono stati scelti per la simulazione, ove possibile, quelli riscontrati nei casi di eterozigosi con espressione di KCNE1 e quelli per i quali è espressamente riportata la bradicardia sinusale. Nel caso della mutazione V141M, Hong et al. [50] affermano che l'eterozigosi di subunità KCNQ1 mutate e wild-type, insieme all'espressione di KCNE1, determina un fenotipo intermedio tra canali  $I_{Ks}$  wild-type e canali costitutivamente aperti. Questo è stato implementato separando la corrente  $I_{Ks}$  a metà, in un termine wild-type e

uno non dipendente da alcuna cinetica:

$$I_{Ks} = \frac{1}{2} \cdot g_{Ks} \cdot n^2 \cdot (V_m - E_K) + \frac{1}{2} \cdot g_{Ks} \cdot (V_m - E_K) \quad (4.14)$$

La figura 4.15B e la tabella 4.4 presentano i risultati delle simulazioni (in figura 4.15B gli AP delle mutazioni G325R e  $\Delta$ F339 risultano sovrapposti). Le mutazioni di tipo gain of function sono compatibili con un fenotipo bradicardico, anche se l'effetto sulla frequenza è minimo (S140G e R231C, le quali abbassano l'MDP prolungando, di conseguenza, il tempo necessario per raggiungere il potenziale di soglia per l'AP), ma quelle che, di fatto, rendono i canali costantemente aperti (V141M e V241F, quest'ultima per via di un drastico shift negativo della curva di attivazione) impediscono al potenziale di membrana di depolarizzarsi. Al contrario, le mutazioni loss of function G325R e  $\Delta$ F339 tendono ad aumentare la frequenza, con un effetto dell'1% sul valore basale (72 bpm), agendo in maniera opposta rispetto ai casi S140G e R231C.

Infine, sono stati simulati, nel presente modello, anche gli effetti delle mutazioni della corrente  $I_{CaL}$  (tabella 3.12). Nelle mutazioni associate alla sindrome di Timothy,  $I_{Na}$  non è soggetta all'inattivazione dipendente dal voltaggio: questo è reso, matematicamente, modificando la curva steady-state di inattivazione in modo che questa non si annulli:

$$fL_{\infty} = \frac{1-k}{1 + e^{\frac{V_m + V_{1/2}}{s}}} + k \quad (4.15)$$

Nello specifico è stato scelto  $k = 0.8$  e  $k = 0.9$  rispettivamente nei casi G406R e G402S. I potenziali d'azione risultanti sono mostrati in figura 4.15C: in tutti i casi mutati cessa l'attività pacemaker. Le mutazioni gain of function G406R e G402S mantengono il potenziale di membrana in uno stato depolarizzato costante, mentre la mutazione loss of function insG403-404 impedisce lo scatenarsi dell'AP ed il potenziale si assesta intorno a -30 mV.

CORRENTE IONICA	MUTAZIONE	SIMULAZIONE HR (CL)	DATI SPERIMENTALI HR (CL)	RIF.
I <sub>f</sub>	G480R	-22% (+27%)	-34% (+52%)	[93]
	A485V	-23% (+30%)	-25% (+33%)	[63]
	K530N	60 bpm (996 ms)	50-60 bpm (1200-1000 ms)	[36]
	S672R	-7% (+8%)	-29% (+40%)	[80]
	573X	69 bpm (866 ms)	41 bpm (1463 ms)	[107]
	695X	-19% (+23%)	-31% (+45%)	[108]
	D553N	60 bpm (998)	39 bpm (1538 ms)	[120]
	M54T	57 bpm (1055 ms)	39-56 bpm (1538-1071 ms)	[87]
I <sub>Na</sub>	ΔKPQ	-16% (+19%)	-17% (+20%)	[124]
	E161K	-15% (+17%)	-24% (+31%)	[112]
	D1275N	-9% (+10%)	SB	[46]
	insD1795-1796	-15% (+17%)	-9% (+10%)	[18]
	ΔK1500	+5% (-5%)	-19% (+23%)	[124]
	D1790G	-15% (+17%)	-9% (+10%)	[124]
	E1784K	63 bpm (958 ms)	42 bpm (1429 ms)	[29]
	NO I <sub>Na</sub>	-15% (+17%)	-14% (+16%)	[62]
	T220I	-11% (+12%)	SB	[17]
	P1298L	-15% (+17%)	SB	[17]
	delF1617	-15% (+17%)	SB	[17]
	R1632H	-15% (+17%)	SB	[17]
	D1595H	-12% (+13%)	SB	[89]
	L212P	-3% (+3%)	SB	[74]
I <sub>Kr</sub>	T613M	+113% (-53%)	fSB	[73]
	G628S	KO	fSB	[73]
I <sub>Ks</sub>	S140G	-2% (+2%)	SB	[24]
	G325R	+1% (-1%)	fSB	[73]
	V141M	KO	fSB	[50]
	ΔF339	73 bpm (825 ms)	43 bpm (1395 ms)	[119]
	R231C	66 bpm (916 ms)	46-61 bpm (1304-984 ms)	[48]
	V241F	KO	30-36 bpm (2000-1667 ms)	[60]
I <sub>CaL</sub>	G406R	KO	fSB	[114]
	G402S	KO	fSB	[114]
	insG403-404	KO	38-52 bpm (1579-1154 ms)	[13]

**Tabella 4.4:** Simulazioni delle mutazioni geniche dei principali canali ionici: effetto sulla frequenza cardiaca (HR) (nel presente modello la frequenza basale è 72 bpm (CL= 833 ms)). *SB*, Sinus Bradycardia; *fSB*, fetal SB; *KO*, assenza di attività pacemaker.

### 4.2.5 Discussione

Il risultato finale, ottenuto dallo sviluppo del presente modello, porta a risultati perfettamente in linea con quanto riportato in letteratura in merito all'elettrofisiologia del nodo senoatriale umano (figure 4.11 e 4.13 e tabella 4.3).

Durante il primo step dello sviluppo, l'aggiornamento della corrente  $I_f$  (equazione (4.7)) è risultato, da solo, sufficiente a portare la firing rate attorno ai valori caratteristici delle cellule umane, confermando un ruolo fondamentale di tale corrente nel determinare e nel controllare la frequenza cardiaca.

Nel modello originale di Severi le curva di attivazione di  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  sono molto vicine a quelle ottenute dai dati di Danielsson et al. [28] (figure 4.7 e 4.8): nel caso di  $I_{Kr}$ ,  $p_{a\infty}$  è spostata a potenziali più positivi, mentre, per quanto riguarda  $I_{Ks}$ ,  $n_{\infty}$  è spostata a potenziali più negativi. Ne deriva che la disponibilità di queste due correnti, dopo l'aggiornamento, risulta diminuita ed aumentata rispettivamente. Tenendo conto, però, del fatto che  $I_{Ks}$  è molto più piccola di  $I_{Kr}$  (circa un ordine di grandezza in meno), il totale della corrente ripolarizzante di potassio risulta ridotto: questo giustifica sia l'aumento di conduttanza  $g_{Kr}$ , sia l'inserimento di una nuova corrente uscente di potassio,  $I_{Kur}$  (in aggiunta ai motivi già descritti nel paragrafo 4.2.2). La  $I_{Kur}$  simulata, inoltre, risulta di ampiezza confrontabile con quella di  $I_{to}$ , quindi non sovrastimata e in linea con un ruolo "secondario" di queste due correnti nelle cellule del nodo del seno (figura 4.12).

L'osservazione del tratto DD (fase 4) dei potenziali d'azione sperimentali ne evidenzia una certa variabilità della morfologia, che costituisce il motivo per cui Verkerk et al. [130] utilizzano, come parametro descrittivo, il valore della pendenza della fase DD nel suo primo tratto di 100 ms dall'MDP ( $DDR_{100}$ ) invece che nella sua intera durata. L'AP generato dal presente modello risulta in accordo con i dati sperimentali anche da questo punto di vista (figura 4.11).

Il transiente di calcio viene anch'esso riprodotto piuttosto fedelmente dal presente

modello (figura 4.13), anche se con una fase di salita leggermente più rapida. Il risultato è stato raggiunto aggiornando, di fatto, un po' tutti gli interpreti del meccanismo CICR: ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula attraverso i canali di calcio L-type e lo scambiatore  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , diffusione dal compartimento subsarcolemmale al cytosol, rilascio e assorbimento da parte del reticolo sarcoplasmatico e buffering del calcio citosolico. Non esistono dati sperimentali di riferimento per l'elevato numero di parametri impiegati nelle descrizioni del calcium-handling presenti nei vari modelli matematici in letteratura, se non il profilo e l'ampiezza del transiente stesso di  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Inoltre, cospicue riduzioni dell'intensità massima di alcune correnti, come quella dello scambiatore sodio-calcio, sono da ritenersi in linea con una minore attività delle stesse, viste le basse frequenze in gioco nell'uomo rispetto al caso del coniglio.

Infine, i valori delle altre concentrazioni ioniche nel presente modello sono 140 mM per  $[\text{K}^+]_i$  (valore costante come nel modello Severi) e 6 mM, con minime fluttuazioni, per  $[\text{Na}^+]_i$  e rientrano nella norma delle concentrazioni fisiologiche.

Verkerk et al. riportano l'aumento del 26% del cycle-length come effetto della perfusione delle cellule SAN umane con 2 mM di cesio (bloccante della corrente  $I_f$ ) [130]. Il modello Severi offre la possibilità di simulare il bloccaggio (di entità voltaggio-dipendente) di  $I_f$  da parte del cesio (5 mM): riproducendo la stessa modalità di bloccaggio nel presente modello, si ottiene una variazione di +20% del CL che è inferiore al dato sperimentale, tenendo conto che questo è ottenuto ad una minore concentrazione di  $\text{Cs}^+$  rispetto a quella simulata. C'è da dire, però, che non è esclusa una modulazione, da parte del cesio, anche di altre correnti di potassio [109] che potrebbe avvicinare i due risultati.

In relazione alla validazione del presente modello rispetto ai dati relativi alle mutazioni geniche, si può affermare che queste vengano complessivamente riprodotte in modo sufficientemente adeguato (ad esclusione di pochi casi) per quanto riguar-

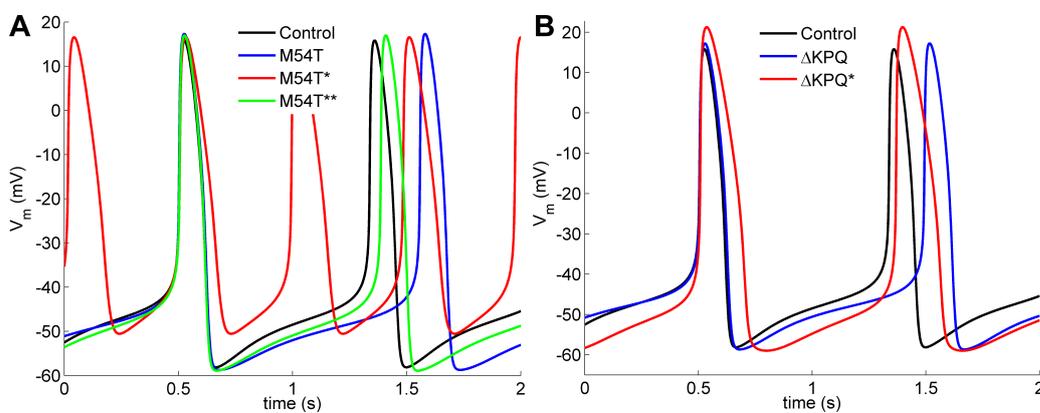
da le correnti  $I_f$  e  $I_{Na}$ . Entrambe sono attive nella fase 4 del potenziale d'azione pacemaker, influenzando sulla corrente netta entrante (chiaramente con un peso maggiore di  $I_f$  rispetto a  $I_{Na}$ ) e, di conseguenza, sulla pendenza della fase stessa. Per queste ragioni, mutazioni di tipo loss of function dei canali ionici responsabili per queste correnti sono compatibili con fenotipi bradicardici e bradiaritmici.

Le mutazioni dei canali del potassio alterano la frequenza cardiaca agendo sulla fase di ripolarizzazione: dalle simulazioni modellistiche si evince che fenotipi gain/loss of function di queste correnti tendono ad iperpolarizzare/depolarizzare il valore di MDP, aumentando/diminuendo il tempo necessario perché il potenziale di membrana raggiunga il valore di soglia per l'upstroke. Per quanto riguarda le mutazioni della corrente  $I_{CaL}$ , il loro contributo alle variazioni di frequenza può essere dedotto in relazione al ruolo della corrente nel potenziale d'azione: attivandosi al termine della fase diastolica,  $I_{CaL}$  può influire in maniera minima sulla firing rate, spostando il potenziale di soglia per l'upstroke, oppure variando la durata dell'AP tramite l'aumento/diminuzione del valore di overshoot.

Nel caso della mutazione M54T, che colpisce la proteina MiRP1, nota essere una subunità modulatrice dei canali HCN4 e anche  $K_v11.1$ , sono state effettuate simulazioni aggiuntive: gli effetti sulla corrente  $I_f$  (M54T) (tabella 3.2, già simulati separatamente, figura 4.14B) sono stati simulati in combinazione a quelli su  $I_{Kr}$  riportati da Lu et al. [71] (M54T\*) e da Abbot et al. [6] (M54T\*\*) (tabella 3.8). Come si nota in figura 4.16A, rispetto ai soli effetti su  $I_f$ , gli effetti loss of function su  $I_{Kr}$  fanno aumentare nuovamente la firing rate, in linea con quanto già visto per le altre mutazioni dei canali del potassio.

In figura 4.16B, invece, viene confrontata la mutazione  $\Delta KPQ$  simulata come in precedenza (figura 4.14C), ovvero secondo gli effetti corrispondenti alla minor intensità della  $I_{Na}$  late riscontrata ( $\Delta KPQ$ ), con la variante simulata secondo gli effetti corrispondenti alla massima  $I_{Na}$  late ( $\Delta KPQ^*$ ). Nel secondo caso la va-

riazione di frequenza è compresa tra il +2 e il +3% ed è dovuta sostanzialmente all'aumento della durata del potenziale d'azione (+60/+65%  $ADP_{90}$ ), mentre la fase diastolica dell'AP è notevolmente accorciata. Si può affermare, quindi, che le mutazioni associate alla corrente  $I_{Na}$  agiscono sia sulla pendenza della fase di depolarizzazione diastolica (come già discusso in precedenza), sia sulla durata del potenziale d'azione.



**Figura 4.16:** Simulazioni, secondo varianti diverse, delle mutazioni M54T (A) e  $\Delta$ KPQ (B).

In conclusione, va considerato che le dinamiche che, in condizioni patologiche, determinano il valore "macroscopico" della frequenza cardiaca sono molto complesse e dipendono dall'interazione di numerosi fattori, nonché dall'attuarsi di meccanismi compensatori più o meno prevedibili a livello di singola cellula. Ciononostante, la simulazione tramite modelli di potenziale d'azione può comunque fornire indicazioni utili e di partenza per ulteriori approfondimenti.

# Capitolo 5

## Mutazione T78M della caveolina-3

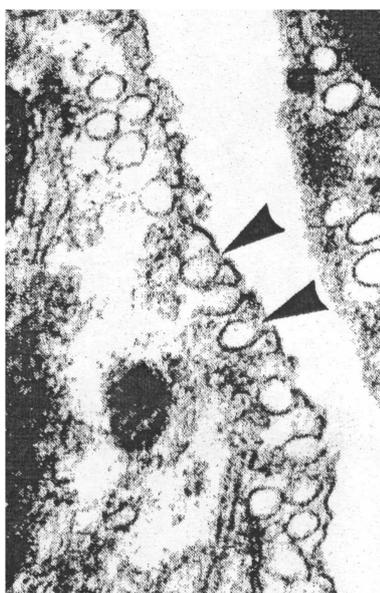
### Introduzione

Dopo aver discusso, nel capitolo 3, delle mutazioni geniche che interessano i canali ionici di membrana delle cellule del tessuto atriale, in questo capitolo verrà preso in esame un caso specifico di mutazione genica relativo alla proteina caveolina-3, la mutazione T78M. Verranno descritte la struttura e la funzione delle caveole e della caveolina e, successivamente, verrà caratterizzata la mutazione T78M dai punti di vista del fenotipo, delle cause e degli effetti indotti sulle correnti ioniche. Successivamente sarà presentato lo sviluppo del modello della mutazione dal punto di vista computazionale ed, infine, utilizzato tale modello per la simulazione in miociti umani atriali (modelli Koivumäki et al. e Grandi et al.) e nodali (modello di nodo senoatriale sviluppato in questa tesi) umani.

### 5.1 Caveole e caveolina

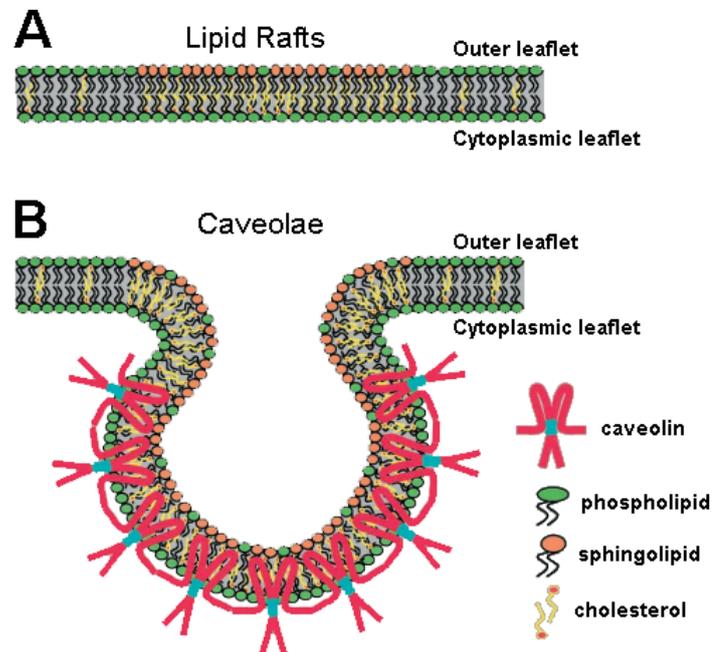
La ricerca e lo studio delle caveole sono iniziati con la loro identificazione morfologica nel 1953. In microscopia elettronica a trasmissione esse appaiono

come strutture simili a piccole cavità, che sono invaginazioni vescicolari della membrana plasmatica di 50-100 nanometri di diametro [139] (figura 5.1). Sono state anche definite come invaginazioni a forma di "omega" o di "fiasco". Le caveole sono considerate un sottoinsieme delle *lipid rafts*, ovvero i microdomini altamente ordinati e ricchi in sfingolipidi localizzati nella membrana plasmatica [139] (figura 5.2).



**Figura 5.1:** Figura tratta da Masson-Pévet et al. [79]: raffigurazione delle caveole in microscopia elettronica.

La caveolina è la principale proteina delle caveole: ne esistono tre isoforme, codificate da geni distinti. La caveolina-1 (Cav-1, codificata dal gene CAV1) e la caveolina-2 (Cav-2, codificata dal gene CAV2) sono espresse nella maggior parte dei tessuti, a livelli diversi nei diversi tipi cellulari, con i più alti livelli negli adipociti, nelle cellule endoteliali, nei fibroblasti, nelle cellule muscolari lisce e in una varietà di cellule epiteliali. Entrambe risultano strettamente coespresse [95, 139]. La caveolina-3 (Cav-3, codificata dal gene CAV3) è invece specificamente espressa nei cardiomiociti e nel muscolo scheletrico [95, 139] e anche, di

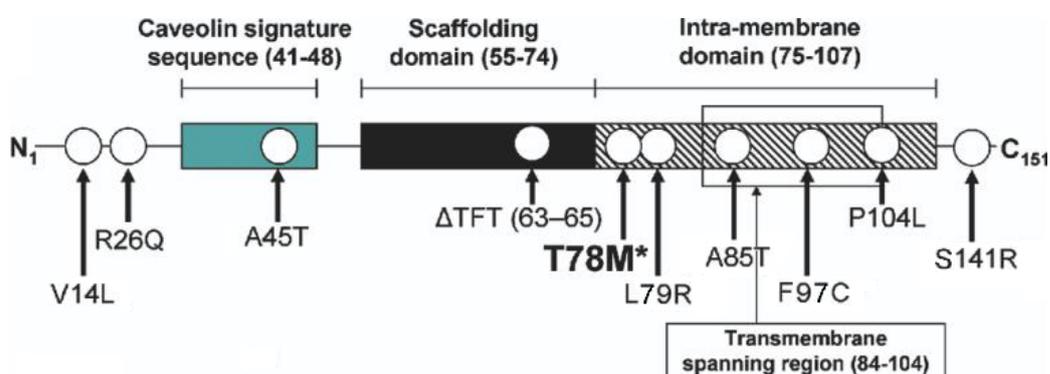


**Figura 5.2:** Figura adattata da Razani et al. 2002 [102]: organizzazione delle lipid rafts e delle caveolae nella membrana fosfolipidica.

più recentemente scoperta, nelle cellule gliali e nei primi nervi periferici post-natali [40]. Dall'allineamento delle sequenze delle tre caveoline umane risulta un alto grado di identità tra Cav-1 e Cav-3, mentre Cav-2 è la più divergente. Tutte e tre hanno, però, un tratto invariante di amminoacidi "FEDVIAEP" (nel codice a una lettera per amminoacido) definito *caveolin signature motif*. Il significato strutturale/funzionale di questo motivo rimane sconosciuto [102, 139].

La caveolina-3 è una proteina di 151 amminoacidi (aa) di lunghezza ed è suddivisa in cinque domini distinti (figura 5.3): dominio N-terminale (aa 1-54) il quale contiene la sequenza di firma (aa 41-48, FEDVIAEP), dominio di scaffolding (aa 55-74), dominio transmembrana (aa 75-107) e dominio C-terminale (aa 108-151) [40].

Il dominio transmembrana forma un'ansa all'interno del sarcolemma e fa in modo che le estremità N- e C-terminali siano rivolte verso il citoplasma. Il segmento



**Figura 5.3:** Figura adattata da Cronk et al. [27]: topologia della proteina caveolina-3 (indicate vi sono le sedi delle mutazioni riscontrate).

di scaffolding è responsabile della oligomerizzazione, processo che ha inizio nel reticolo endoplasmatico dove la caveolina viene sintetizzata [40]. Da qui, passando per il complesso del Golgi, le caveoline interagiscono tra loro per formare omo- ed etero-oligomeri, i quali mostrano un'elevata affinità per il colesterolo e per i glicosfingolipidi (altamente concentrati in corrispondenza delle lipid rafts). Queste interazioni proteina-proteina e proteina-lipide permettono alle caveoline di legarsi alla membrana lipidica trasformandone la morfologia e rappresentano, quindi, gli elementi chiave che determinano la formazione delle caveole [95, 102] (figura 5.2). Infine, all'interno del sarcolemma, la caveolina appartiene al complesso distrofina-glicoproteine che fornisce un collegamento tra il citoscheletro e la matrice extracellulare ed è essenziale per conferire stabilità alla membrana delle cellule [40].

Oltre a costituire la componente strutturale fondamentale delle caveole, la caveolina è sia una proteina di ancoraggio per le molecole all'interno delle caveole, sia un elemento di regolazione dei segnali gestiti da proteine. Le caveole sono, infatti, coinvolte nel traffico vescicolare e servono come piattaforme per la compartimentazione e concentrazione, in stretta prossimità, di molecole segnale e diverse proteine della via di trasduzione  $\beta$ -adrenergica [122, 139]; le caveole svolgono anche

un ruolo importante nella omeostasi del colesterolo.

Nelle caveole dei cardiomiociti sono stati specificamente localizzati alcuni importanti canali ionici, tra i quali HCN4, Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>3.2, K<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.5 e NCX1. Pertanto, le caveole possono influenzare anche la regolazione della funzione dei canali ionici: ciò evidenzia un probabile ruolo delle caveole e della caveolina-3 nell'eccitabilità cardiaca [122].

## 5.2 Descrizione della mutazione T78M

Il ruolo critico della caveolina-3 nella fisiologia delle cellule muscolari è stato mostrato per la prima volta attraverso studi in vitro e in vivo ed è stato definitivamente confermato dai risultati secondo i quali le mutazioni nel gene codificante per la caveolina-3 portano a disturbi neuromuscolari e cardiaci distinti, come la distrofia muscolare dei cingoli (LGMD, *Limb Girdle Muscular Dystrophy*) di tipo 1C, l'elevazione idiopatica persistente della creatin chinasi sierica (H-CK, *HyperCKemia*), la miopatia con rippling muscolare ereditaria (RMD, *Rippling Muscle Disease*), la miopatia distale (DM, *Distal myopathy*) e la cardiomiopatia ipertrofica familiare (HCM, *Hypertrophic CardioMyopathy*) [40]. In particolare, negli ultimi anni, mutazioni nel gene CAV3 sono state riscontrate in presenza di varie sindromi aritmogene, tra le quali quella del QT lungo (LQTS, *Long QT Syndrome*) [122] e nella sindrome della morte improvvisa infantile (SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome*) [27].

Nel caso specifico in esame, anche la T78M e una mutazione che colpisce il gene CAV3 della caveolina-3.

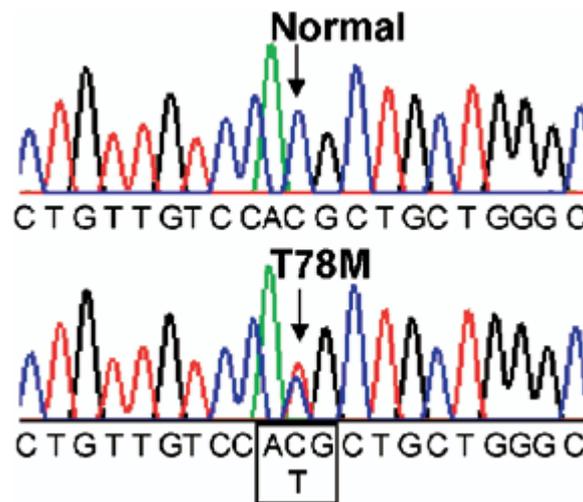
### 5.2.1 Fenotipo

La mutazione T78M della caveolina-3 è stata associata alle sindromi del QT lungo [121] (prolungamento dell'intervallo QT all'ECG caratterizzato da una ritardata ripolarizzazione delle cellule miocardiche) e della morte improvvisa infantile [27] (morte improvvisa ed inaspettata di un lattante apparentemente sano). Inoltre, i dati forniti da Andrea Barbuti e provenienti dal laboratorio del Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano, mostrano casi di aritmie in presenza della mutazione T78M: in particolare, la mutazione è stata trovata in 2 pazienti con fibrillazione atriale (AF, *Atrial Fibrillation*: aritmia in cui gli atri si contraggono frequentemente e in modo irregolare a causa di impulsi elettrici caotici e disorganizzati), in 4 pazienti con tachicardia sinusale inappropriata (IST, *Inappropriate Sinus Tachycardia*: aritmia in cui il ritmo sinusale è notevolmente aumentato in condizioni basali), in 2 campioni di DNA da stillbirth (feti abortiti in utero prima del parto). Poiché la T78M non è una mutazione che interessa un canale ionico specifico, ma colpisce la proteina Cav-3, che a sua volta interagisce con i canali ionici di membrana, essa può alterare l'attività di canali diversi. Questo è probabilmente il motivo principale della varietà di fenotipi riscontrati e, ad esso, potrebbe aggiungersi il tipo cellulare in cui si analizza la mutazione, l'età, o, ancora, potrebbero instaurarsi meccanismi compensatori per cui, alla fine, un fenotipo prevalga su un altro.

### 5.2.2 Cause

L'analisi genetica del gene CAV3 mutato ha portato all'identificazione di una mutazione missenso nell'esone 2, al nucleotide numero 233 (timina al posto della citosina, figura 5.4) che determina la sostituzione dell'amminoacido treonina (codificato dalla tripletta ACG) con l'amminoacido metionina (codificato dalla

tripletta AUG), in corrispondenza del codone 78 [104]. Da qui il nome T78M.



**Figura 5.4:** Figura tratta da Cronk et al. 2007 [27]: cromatogrammi del sequenziamento del DNA per la mutazione T78M del gene CAV3.

### 5.2.3 Effetti sulle correnti ioniche

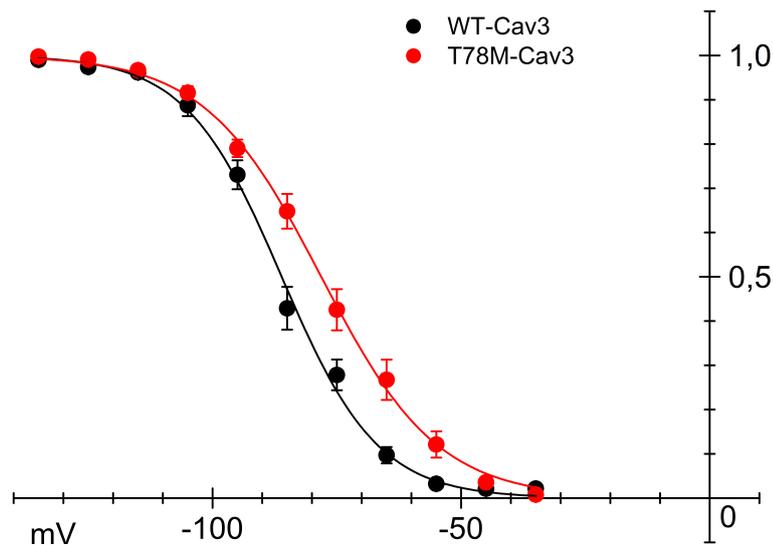
In presenza della mutazione T78M, sono state riscontrate alterazioni significative dell'attività e della cinetica di diversi canali ionici della membrana cellulare dei miociti atriali, in particolare i canali HCN4 (associato alla corrente funny  $I_f$ ),  $K_v1.5$  (associato alla corrente ultra rapida di potassio  $I_{Kur}$ ),  $Na_v1.5$  (associato alla corrente di sodio  $I_{Na}$ ) e Kir2.1 (associato alla corrente inward rectifier  $I_{K1}$ ).

#### 5.2.3.1 Effetto su $I_f$

In figura 5.5 sono mostrane le curve di (de)attivazione di  $I_f$  nei casi di caveolina-3 wild-type (WT-Cav3) e mutata (T78M-Cav3). I dati<sup>1</sup> ottenuti da prove di voltage-clamp su fibroblasti embrionali di topo *caveolin-free* (non esprimenti la caveolina-

<sup>1</sup>I dati sono forniti da Andrea Barbuti e provengono dal laboratorio del Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano.

3) trasfettati con canali humanHCN4 insieme a WT-Cav3 o a T78M-Cav3, sono fittati tramite equazione di Boltzmann con parametri  $V_{1/2}$  e *slope* rispettivamente -86.0746 mV e 9.66316 (WT), -78.12668 mV e 11.68919 (T78M).



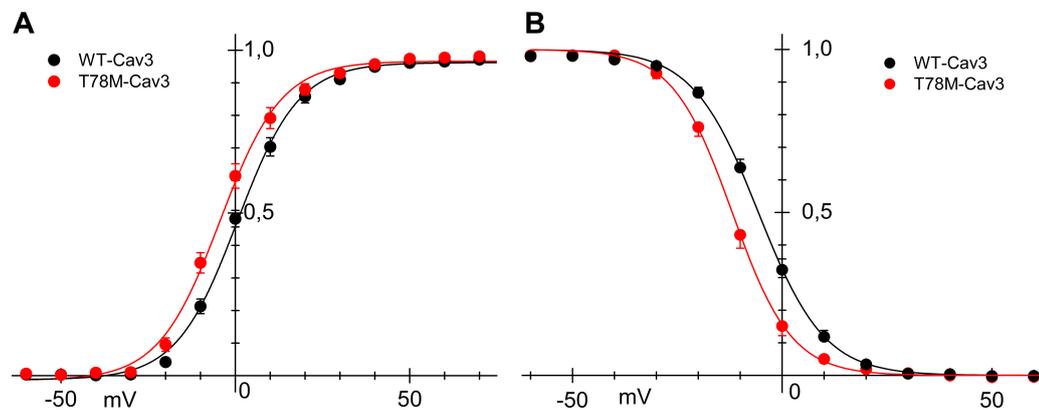
**Figura 5.5:** Dati forniti da Andrea Barbuti: curve steady-state di (de)attivazione di  $I_f$  nei casi di caveolina-3 wild-type (WT-Cav3) e mutata (T78M-Cav3).

La mutazione T78M induce, quindi, nella curva di attivazione dei canali HCN4, uno shift di  $\sim 7.95$  mV verso potenziali più positivi e un aumento della slope di  $\sim 21\%$ . A conferma di questo, sono stati eseguiti esperimenti<sup>2</sup> anche sulla  $I_f$  endogena di cardiomiociti neonatali di ratto trasfettati con WT-Cav3 o T78M-Cav3 e i risultati sono pressochè uguali, lo shift osservato è di  $\sim 7$  mV (dati non mostrati). L'effetto della mutazione su questi canali è di tipo gain of function, in quanto, a parità di potenziale, nel caso mutato la curva steady-state ha valori maggiori e, dunque, la disponibilità di corrente al dato potenziale risulta maggiore del caso WT.

<sup>2</sup>I dati sono forniti da Andrea Barbuti e provengono dal laboratorio del Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano.

### 5.2.3.2 Effetto su $I_{Kur}$

In figura 5.6 sono mostrane le curve di attivazione (A) e inattivazione (B) di  $I_{Kur}$  nei casi WT-Cav3 e T78M-Cav3. I dati<sup>3</sup>, ottenuti da prove di voltage-clamp su caveolin-free MEF trasfettati con canali humanK<sub>v</sub>1.5 insieme a WT-Cav3 o a T78M-Cav3, sono fittati tramite equazione di Boltzmann con parametri  $V_{1/2}$  e *slope* rispettivamente 0.58577 mV e 8.76484 (attivazione, WT), -4.39442 mV e 8.8117 (attivazione, T78M); -5.68006 mV e 7.82786 (inattivazione, WT), -11.92167 mV e 7.06872 (inattivazione, T78M).



**Figura 5.6:** Dati forniti da Andrea Barbuti: curve steady-state di attivazione (A) e inattivazione (B) di  $I_{Kur}$  nei casi di caveolina-3 wild-type (WT-Cav3) e mutata (T78M-Cav3).

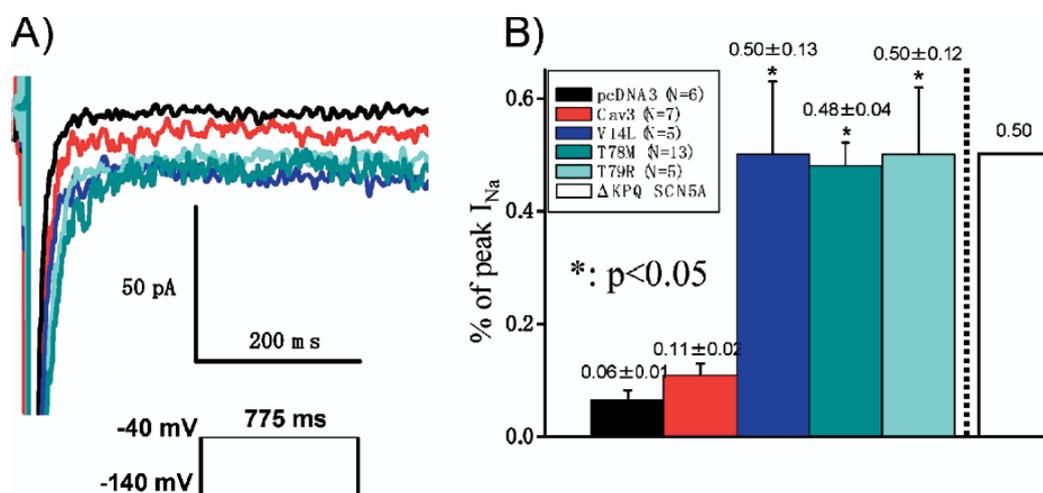
La mutazione induce, quindi, nella curva di attivazione, uno shift di  $\sim 4.98$  mV verso potenziali più negativi e un aumento della slope di  $\sim 0.5\%$ ; nella curva di inattivazione, uno shift di  $\sim 6.24$  mV verso potenziali più negativi e una riduzione della slope di  $\sim 9.7\%$ . Analizzando le sole curve steady-state, non è immediato definire di che tipo sia l'effetto della mutazione su questi canali, se gain o loss of function. A posteriori, osservando il potenziale d'azione risultante dall'applicazione

<sup>3</sup>I dati sono forniti da Andrea Barbuti e provengono dal laboratorio del Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano.

cazione del solo effetto su  $I_{Kur}$  (si veda più avanti, paragrafo 5.5 e figura 5.17), si può affermare che la mutazione induce sui canali  $K_v1.5$  un effetto di tipo gain of function, in quanto la corrente risulta aumentata e il potenziale d'azione di conseguenza accorcia la propria durata durante la ripolarizzazione.

### 5.2.3.3 Effetto su $I_{Na}$

Dallo studio di Cronk et al. [27], effettuato su cellule renali embrionali umane (HEK 293) esprimenti stabilmente la variante di splicing più comune (Q1077del) di SCN5A e trasfettate con caveolina-3 wild-type e mutata (V14L, T78M, T79R), risulta che la mutazione T78M non induce variazioni significative sui parametri ( $V_{1/2}$  e *slope*) delle curve di attivazione e inattivazione, ma produce un significativo aumento della corrente  $I_{Na}$  late.



**Figura 5.7:** Figura tratta da Cronk et al. 2007 [27]: A, corrente late  $I_{Na}$  misurata nei casi WT e T78M (insieme anche ad altre mutazioni) durante il voltage-clamp raffigurato; B, sommario dei valori di intensità della corrente late espressi in percentuale del picco.

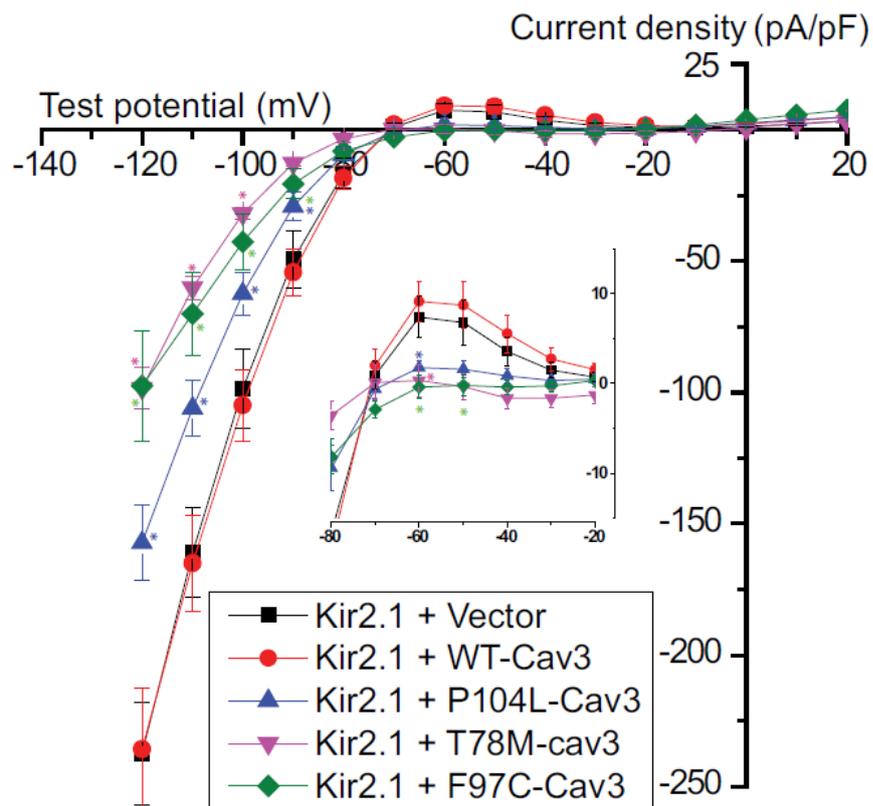
Dalla figura 5.7 si evince che nel caso mutato, durante un voltage-clamp della durata di 775 ms da un potenziale di holding di -140 mV a un potenziale di test di -40 mV (figura 5.7A), l'intensità della corrente corrisponde allo 0.48% del picco

massimo di  $I_{Na}$ , al contrario del caso wild-type in cui la corrente è lo 0.11% del picco (figura 5.7B).

La mutazione induce, quindi, un aumento della componente late della corrente di sodio (misurata tramite il voltage-clamp di figura 5.7A), portano la sua intensità a fine step dallo 0.11% allo 0.48% del picco: corrisponde ad un aumento di  $\sim 4.36$  volte, pari cioè al rapporto  $0.48/0.11$ . Per questo motivo, l'effetto della mutazione su questi canali risulta essere di tipo gain of function.

### 5.2.3.4 Effetto su $I_{K1}$

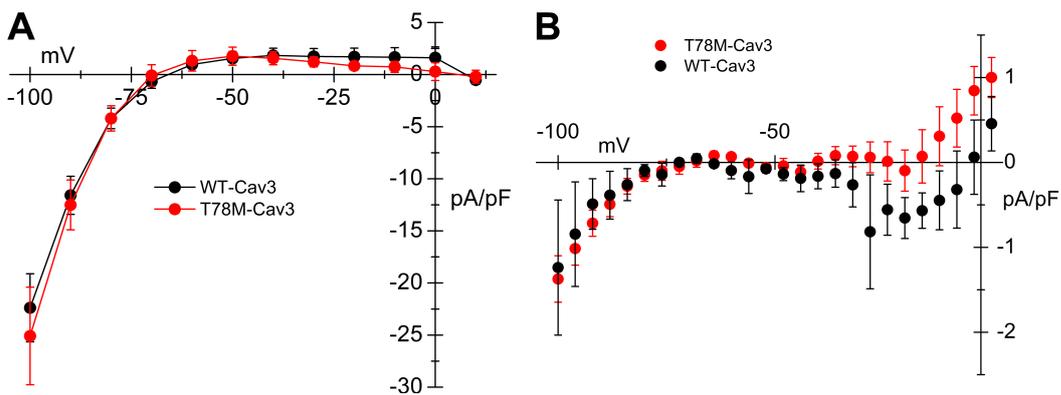
In figura 5.8 è mostrata la relazione I-V della corrente  $I_{K1}$  nei casi WT-Cav3



**Figura 5.8:** Figura tratta da Vaidyanathan et al. 2013 [121]: relazione I-V della corrente  $I_{K1}$  nei casi WT w T78M (insieme anche ad altre mutazioni).

e T78M-Cav3 (oltre ad altri casi di mutazione, ovvero P104L e F97C). Le cellule utilizzate in questo lavoro sono HEK 293, trasfettate con Kir2.1 e Cav3 wild-type o mutata. La mutazione provocherebbe una riduzione accentuata della corrente  $I_{K1}$  a tutti i potenziali e avrebbe, dunque, un effetto loss of function sul canale Kir2.1.

Contrariamente a quanto riportato da Vaidyanathan et al., i dati<sup>4</sup> ottenuti da cellule caveolin-free MEF trasfettati con humanKir2.1 insieme a WT-Cav3 o a T78M-Cav3 (figura 5.9A), permettono di concludere che la mutazione in esame non determina nessuna significativa variazione dell'intensità della corrente  $I_{K1}$  in presenza della caveolina mutata. La stessa conclusione è, inoltre, confermata dai dati<sup>5</sup> su cardiomiociti neonatali di ratto di figura 5.9B.



**Figura 5.9:** Dati forniti da Andrea Barbuti: relazione I-V della corrente  $I_{K1}$  nei casi WT-Cav3 e T78M-Cav3 in cellule MEF (A) e in cardiomiociti neonatali di ratto (B).

I dati esaminati sono in contrasto tra loro: da una parte, secondo Vaidyanathan et al., si avrebbe un fenotipo loss of function molto accentuato sui canali Kir2.1, dall'altra l'effetto sarebbe trascurabile o del tutto nullo.

<sup>4,5</sup> I dati sono forniti da Andrea Barbuti e provengono dal laboratorio del Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano.

## 5.3 Modello matematico della mutazione

In base a quanto descritto nel paragrafo precedente, gli effetti della mutazione T78M della caveolina-3 sui canali ionici relativi alle correnti  $I_f$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  sono stati formulati dal punto di vista matematico per ottenere un modello completo della mutazione. Di seguito vengono presentate le formulazioni separatamente per corrente ionica.

### 5.3.1 Corrente $I_f$

La mutazione T78M induce sulla corrente  $I_f$  uno shift a destra di  $\sim 7.95$  mV e un aumento del  $\sim 21\%$  dello slope-factor della curva di attivazione. La formulazione (con i precisi valori delle variazioni) di tale effetto risulta dunque essere la seguente:

$$y_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2} - 7.94792}{s * 1.20966537}}} \quad (5.1)$$

### 5.3.2 Corrente $I_{Kur}$

La mutazione T78M induce sulla corrente  $I_{Kur}$  uno shift a sinistra di  $\sim 4.98$  mV e un aumento dello  $\sim 0.5\%$  dello slope-factor della curva di attivazione; induce, inoltre, uno shift a sinistra di  $\sim 6.24$  mV e una riduzione del  $\sim 9.7\%$  dello slope-factor della curva di inattivazione. Le formulazioni (con i precisi valori delle variazioni) di tale effetto risultano dunque essere le seguenti:

$$r_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2} + 4.98019}{s * 1.0534636}}} \quad (5.2)$$

$$s_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2} + 6.24161}{s * 0.90302075}}} \quad (5.3)$$

### 5.3.3 Corrente $I_{Na}$

La mutazione T78M induce sulla corrente  $I_{Na}$  un aumento della late  $I_{Na}$  la cui intensità, durante il gradino di voltage-clamp descritto in precedenza, risulta essere lo 0.48% del picco di corrente a inizio gradino (contro lo 0.11% nel caso non mutato). Si è deciso di simulare l'effetto aggiungendo un contributo chiamato  $I_{Na\_late}$  che è stato formulato allo stesso modo della corrente  $I_{NaL}$  utilizzata nel modello Grandi et al. [43] per simulare la condizione di fibrillazione atriale:

$$I_{Na\_late} = g_{NaL} \cdot m_L^3 \cdot h_L \cdot (V_m - E_{Na}) \quad (5.4)$$

$$\frac{dm_L}{dt} = \alpha_{m_L} \cdot (1 - m_L) - \beta_{m_L} \cdot m_L \quad (5.5)$$

$$\alpha_{m_L} = \frac{320 \cdot (V_m + 47.13)}{1 - e^{-0.1 \cdot (V_m + 47.13)}} \quad (5.6)$$

$$\beta_{m_L} = 80 \cdot e^{\frac{-V_m}{11}} \quad (5.7)$$

$$\frac{dh_L}{dt} = \frac{h_{L\infty} - h_L}{\tau_{h_L}} \quad (5.8)$$

$$h_{L\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m + 91}{6.1}}} \quad (5.9)$$

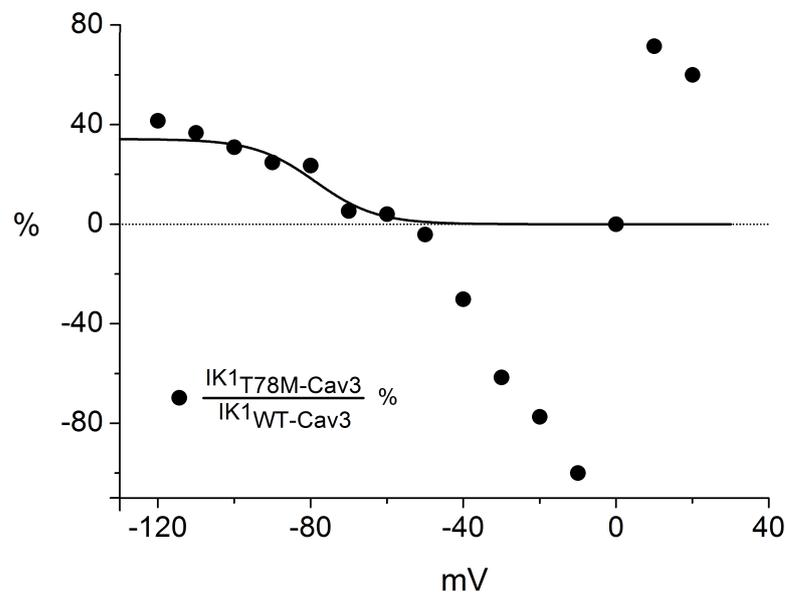
$$\tau_{h_L} = 600 \text{ ms} \quad (5.10)$$

Per decidere il valore della conduttanza  $g_{NaL}$  è stato riprodotto il protocollo di voltage-clamp descritto in figura 5.7A. Per prima cosa, è stata verificata, secondo tale protocollo, l'entità della corrente  $I_{Na}$  in condizioni di controllo e si è fatto in modo che l'intensità (prendendo come riferimento il suo valore a fine gradino)

fosse lo 0.11% del picco massimo a inizio gradino (questa modifica è stata ottenuta in maniera diversa a seconda del modello scelto per la simulazione, per cui, per il dettaglio, si vedano i paragrafi seguenti, 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3). Nel caso mutato, la conduttanza  $g_{NaL}$  è stata poi regolata in modo che la percentuale di corrente, rispetto al picco massimo, fosse, lo 0.48%.

### 5.3.4 Corrente $I_{K1}$

Secondo Vaidyanathan et al. [121], la mutazione T78M induce una riduzione dell'intensità della corrente  $I_{K1}$ : calcolando il rapporto tra i dati relativi al caso T78M e WT (estratti dalla figura 5.8) ed esprimendolo in percentuale, si ottengono i punti in figura 5.10, che esprimono la quantità di corrente in presenza della mutazione rispetto al caso di controllo.



**Figura 5.10:** Rapporto, espresso in percentuale, tra i dati relativi al caso T78M e WT di figura 5.8 e relativo fitting.

Tali dati sono stati fittati tramite una curva sigmoide ottenuta trascurando i punti a potenziali eccessivamente negativi (non raggiungibili durante un potenziale d'a-

zione) e annullando tutti quelli a potenziali superiori a -60 mV (in figura 5.8, a tali potenziali, in presenza della mutazione T78M, la corrente  $I_{K1}$  transitoriamente si inverte nuovamente e ritorna negativa, cosa non verosimile e, probabilmente, dovuta a incertezze nella misura; è sensato ritenere nulla la corrente). Inoltre si è cercato di tenere maggiormente in considerazione per il fitting il dato a -60 mV in quanto espressamente indicato [121] (al contrario gli altri punti sono stati estratti manualmente dalla figura 5.8).

La curva sigmoide risulta:

$$\frac{0.3421}{1 + e^{\frac{V_m + 78.7301}{8}}} \cdot 100\% \quad (5.11)$$

D'altro canto, facendo riferimento esclusivamente ai dati di figura 5.9, l'effetto della mutazione T78M su  $I_{K1}$  appare nullo o comunque trascurabile.

È stata impostata la formulazione seguente:

$$\bar{g}_{K1} = g_{K1} \cdot K \quad (5.12)$$

considerando un effetto modulatorio sulla corrente e dove  $K$  può essere scelto tra più opzioni possibili, ovvero:

1.  $K$  può assumere la forma della sigmoide (5.11) (non espressa in percentuale), corrispondente ad una notevole riduzione voltaggio-dipendente, di entità compresa tra  $\sim 65\%$  fino al 100%;
2.  $K$  può assumere valore unitario, corrispondente a un effetto nullo;
3.  $K$  può assumere un valore costante ( $< 1$ ) tale da produrre una riduzione della corrente di una quota arbitraria intermedia tra le due opzioni precedenti.

L'intensità di  $I_{K1}$  è di difficile misurazione soprattutto ai potenziali diastolici e, nel caso di un possibile effetto di riduzione della corrente dato dalla mutazione, più

che una modulazione voltaggio-dipendente, è plausibile un bloccaggio di entità costante all'interno del range di potenziali. Per questo ed altri motivi (si veda la discussione al paragrafo 5.5), unitamente alla scelta di ricondursi ad un set unico di dati, provenienti dallo stesso laboratorio, si è deciso, per il modello matematico della mutazione, di considerare inalterata la corrente  $I_{K1}$ .

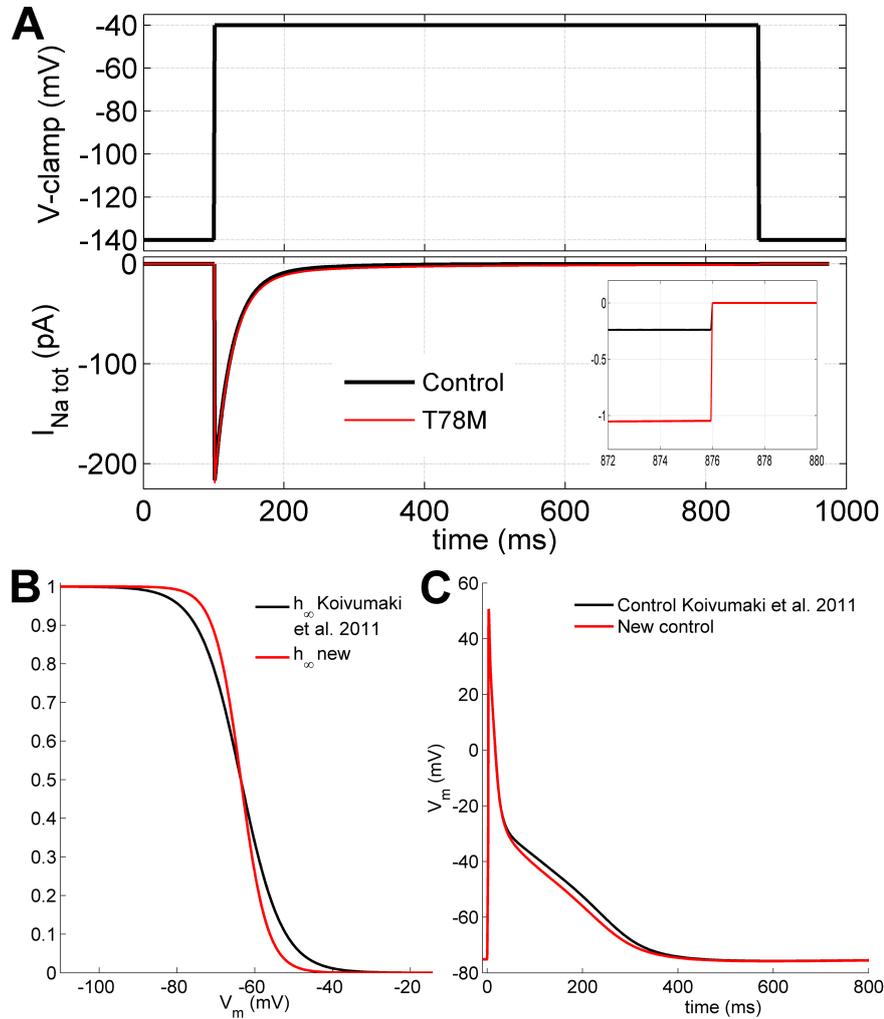
## 5.4 Simulazione modellistica

Il modello matematico della mutazione T78M della caveolina-3 descritto nel paragrafo precedente è stato implementato all'interno dei modelli di cellule atriali umane non specializzate, ovvero i modelli Koivumäki et al. [61] (*Koivumäki*) e Grandi et al. [43] (*Grandi*), e di cellula specializzata, ovvero il modello di nodo senoatriale umano oggetto di questo lavoro di tesi e descritto in precedenza nel capitolo 4.

### 5.4.1 Modello Koivumäki

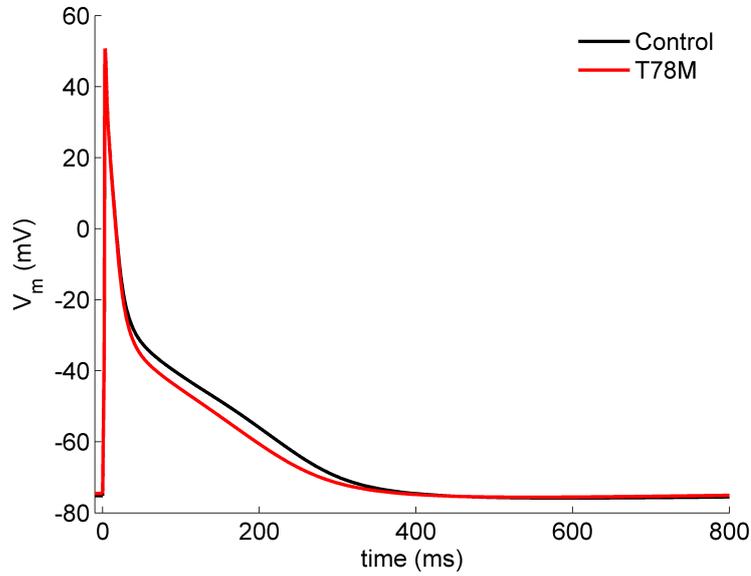
Per effettuare la simulazione nel modello Koivumäki è stata applicata una modifica alla versione originale pubblicata [61], necessaria per simulare l'effetto della corrente  $I_{Na}$  (paragrafo 5.3.3). È stata modificata la curva di steady-state inactivation  $h_{\infty}$  della corrente  $I_{Na}$ , per ottenere, in condizione di controllo, nel protocollo di voltage-clamp riprodotto come in Cronk et al. [27] (figura 5.11A), una componente late  $I_{Na}$  che fosse lo 0.11% del picco: nel modello originale, la  $I_{Na}$  ha intensità pari a  $\sim 1.27\%$  del picco, per cui  $h_{\infty}$  è stata resa più ripida per ridurre la percentuale fino allo 0.11. La maggiore ripidità (ottenuta riducendo lo slope factor) rende l'inattivazione più marcata, riducendo l'ampiezza della corrente late. La modifica è riportata in figura 5.11B e la nuova versione control (-2.9% APD<sub>30</sub>, +0.3% APD<sub>50</sub>, -7.7% APD<sub>90</sub>, +1.5% APA, +0 mV RMP, +1.8 mV OS) è

presentata in figura 5.11C. Nel caso mutato, viene inserita  $I_{Na\_late}$  con conduttanza 1.23 nS per ottenere lo 0.48% (figura 5.11A).



**Figura 5.11:** Modifica alla versione control del modello Koivumäki [61]: A, riproduzione del protocollo di voltage-clamp come in Cronk et al. [27]; B, variazione della pendenza di  $h_\infty$ ; C, versione control modificata (con stimolazione a 1 Hz).

A partire da questo nuovo controllo, sono state applicate le formulazioni che modellano la mutazione T78M: la (5.1) per  $I_f$ , le (5.2) e (5.3) per  $I_{Kur}$  e infine le (5.4)-(5.10) per  $I_{Na}$ . Il risultato della simulazione (a 1 Hz) della condizione mutata, confrontata con il controllo, è presentato in figura 5.12.



**Figura 5.12:** Simulazione (a 1 Hz) della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello Koivumäki.

### 5.4.2 Modello Grandi

Per effettuare la simulazione nel modello Grandi, in quanto assente nella versione originale pubblicata [43], è stata prima inserita una formulazione di  $I_f$  basata su quella del modello Koivumäki, nel quale  $I_f$  è stata derivata dalle equazioni e dai dati di Zorn-Pauly et al. su miociti atriali umani [143]:

$$I_{fNa} = y \cdot g_f \cdot 0.2677 \cdot (V_m - E_{Na}) \quad (5.13)$$

$$I_{fK} = y \cdot g_f \cdot (1 - 0.2677) \cdot (V_m - E_K) \quad (5.14)$$

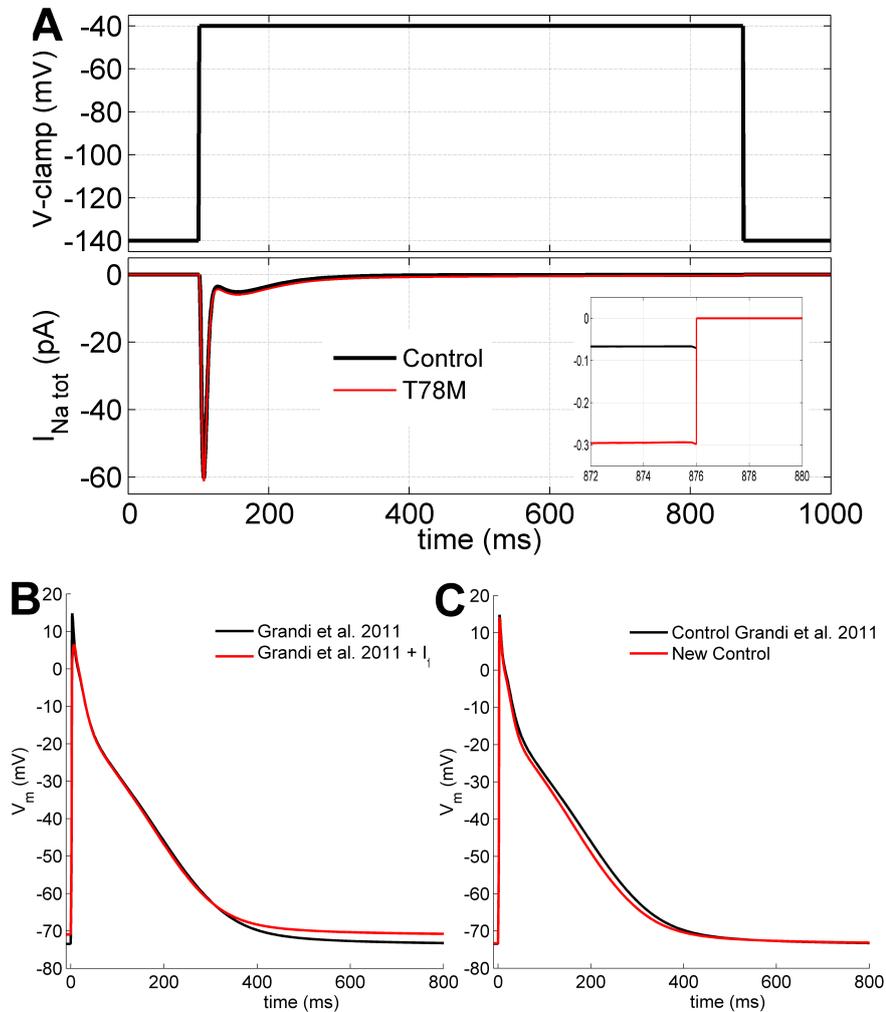
$$g_f = 0.02 \text{ mS}/\mu\text{F} \quad (5.14)$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{y_\infty - y}{\tau_y} \quad (5.15)$$

$$y_\infty = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m + 97.82874}{12.48025}}} \quad (5.16)$$

$$\tau_y = \frac{1}{0.00332 \cdot e^{\frac{-V_m}{16.54103}} + 23.71839 \cdot e^{\frac{V_m}{16.54103}}} \quad (5.17)$$

In seguito all'inserimento della corrente  $I_f$ , nell'AP risultante il picco si abbassa di  $\sim 8$  mV e il potenziale di riposo si alza di  $\sim 3$  mV (figura 5.13B).



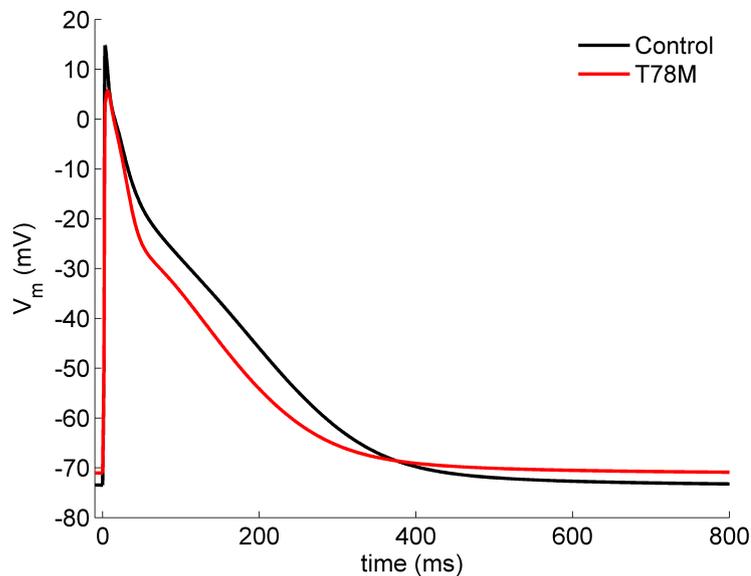
**Figura 5.13:** Modifica alla versione control del modello Grandi [43]: A, riproduzione del protocollo di voltage-clamp come in Cronk et al. [27]; B, versione control dopo l'inserimento della corrente  $I_f$ ; C, versione control modificata (con stimolazione a 1 Hz).

Per correggere tali variazioni, è stata aumentata dell'8% la conduttanza della corrente  $I_{K1}$  ed è stata portata a 140 mM la concentrazione intracellulare costante di potassio  $[K^+]_i$ , che nella versione originale del modello è fissata a 120 mM.

Infine, è stata applicata un'ulteriormente modifica, necessaria per simulare l'effett-

to della corrente  $I_{Na}$  (paragrafo 5.3.3). Per ottenere, in condizione di controllo, nel protocollo di voltage-clamp riprodotto come in Cronk et al. [27] (figura 5.13A), una componente late  $I_{Na}$  che fosse lo 0.11% del picco, è stata aggiunta la corrente  $I_{Na\_late}$  anche in condizione control, con conduttanza  $0.0008575 \text{ mS}/\mu\text{F}$ , perché è risultato che, nel modello originale, la  $I_{Na}$  avesse intensità pari soltanto a  $\sim 0.008\%$  del picco. La nuova versione control (-7.4% APD<sub>30</sub>, -8.3% APD<sub>50</sub>, -5.5% APD<sub>90</sub>, -0.9% APA, +0.1 mV RMP, -0.7 mV OS) è presentata in figura 5.13C. Nel caso mutato, la conduttanza viene invece aumentata a  $0.0040216 \text{ mS}/\mu\text{F}$  per ottenere lo 0.48% (figura 5.13A).

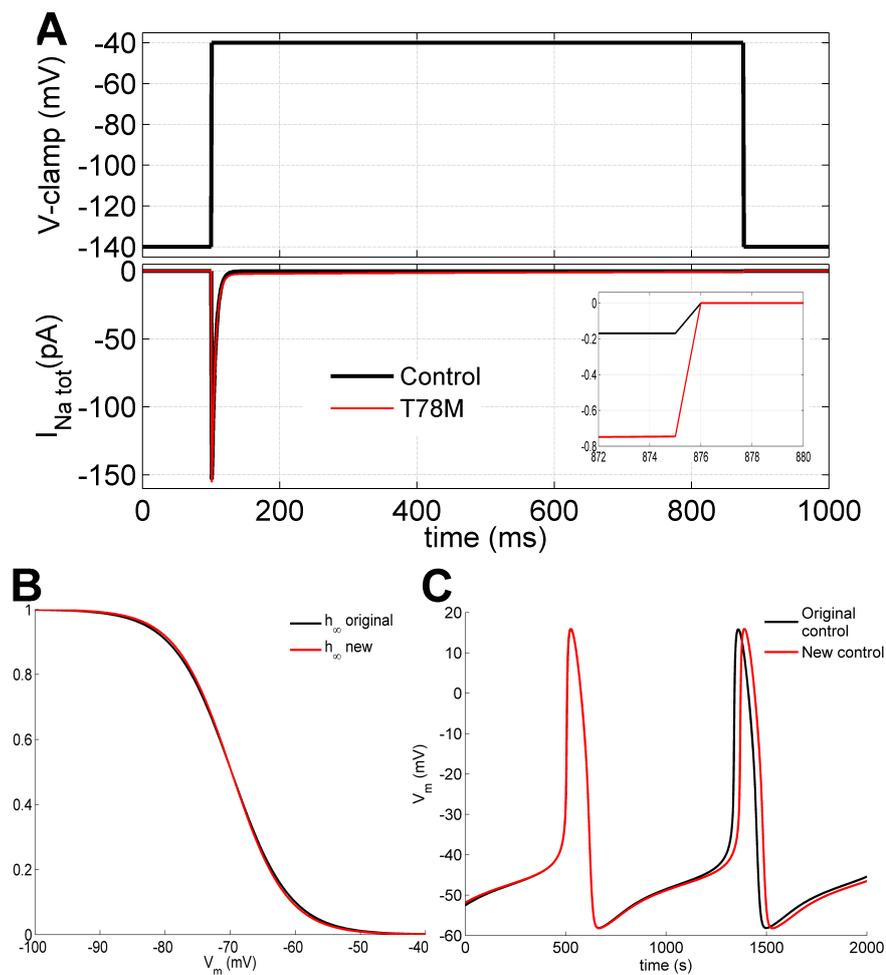
A partire da questa versione modificata del modello Grandi, sono state applicate le formulazioni che modellano la mutazione T78M, ovvero la (5.1) per  $I_f$ , le (5.2) e (5.3) per  $I_{Kur}$  e infine le (5.4)-(5.10) per  $I_{Na}$ . Il risultato della simulazione (a 1 Hz) è presentato in figura 5.14.



**Figura 5.14:** Simulazione (a 1 Hz) della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello Grandi.

### 5.4.3 Modello SAN umano

Per effettuare la simulazione nel modello di nodo senoatriale umano è stata applicata una modifica alla versione del modello descritta nel capitolo 4, necessaria per simulare l'effetto della corrente  $I_{Na}$  (paragrafo 5.3.3).

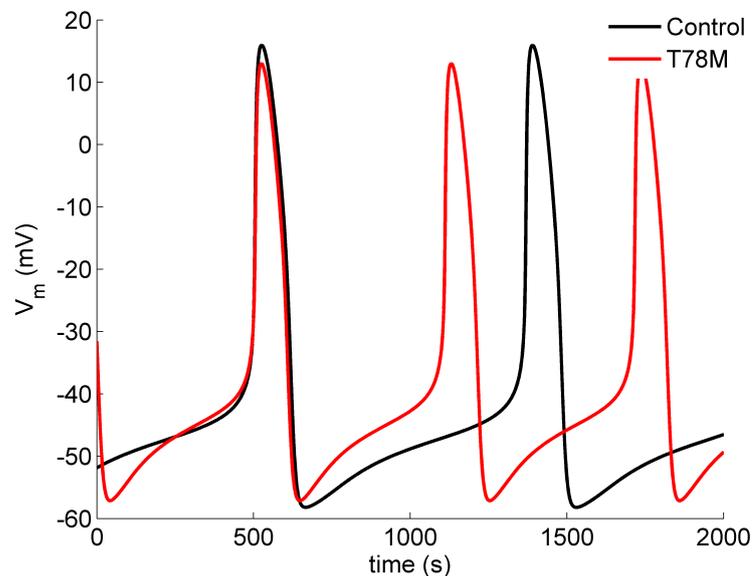


**Figura 5.15:** Modifica alla versione control del modello SAN umano descritto al capitolo 4: A, riproduzione del protocollo di voltage-clamp come in Cronk et al. [27]; B, variazione della pendenza di  $h_\infty$ ; C, versione control modificata.

È stata modificata la curva di steady-state inactivation  $h_\infty$  della corrente  $I_{Na}$ , per ottenere, in condizione di controllo, nel protocollo di voltage-clamp riprodotto

come in Cronk et al. [27] (figura 5.15A), una componente late  $I_{Na}$  che fosse lo 0.11% del picco: nella versione di partenza, la  $I_{Na}$  ha intensità pari a  $\sim 0.16\%$  del picco, per cui  $h_{\infty}$  è stata resa più ripida per ridurre la percentuale fino allo 0.11. La maggiore ripidità (ottenuta riducendo lo slope factor) rende l'inattivazione più marcata, riducendo l'ampiezza della corrente late. La modifica è riportata in figura 5.15B e la nuova versione control (+3.7% CL, +0.0% APD<sub>20</sub>, +0.6% APD<sub>50</sub>, +0.0% APD<sub>90</sub>, +0.2% APA, -0.1 mV MDP, +0.1 mV OS, -4.3% DDR<sub>100</sub>, +0.4%  $V_{max}$ ) è presentata in figura 5.15C. Nel caso mutato, viene inserita  $I_{Na\_late}$  con conduttanza  $0.000727 \mu S$  per ottenere lo 0.48% (figura 5.15A).

A partire da questo nuovo controllo, sono state applicate le formulazioni che modellano la mutazione T78M: la (5.1) per  $I_f$ , le (5.2) e (5.3) per  $I_{Kur}$  e infine le (5.4)-(5.10) per  $I_{Na}$ . Il risultato della simulazione della condizione mutata, confrontata con il controllo, è presentato in figura 5.16.



**Figura 5.16:** Simulazione della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello di nodo senoatriale umano.

## 5.5 Discussione

Nelle figure 5.12, 5.14 e 5.16 sono ben visibili gli effetti simulati della mutazione T78M sui vari potenziali d'azione. Le variazioni dei parametri degli AP sono elencate nelle tabelle 5.1 e 5.2.

	KOIVUMÄKI	GRANDI
APD <sub>30</sub> (%)	-1.9	+10.5
APD <sub>50</sub> (%)	-6.9	-10.6
APD <sub>90</sub> (%)	-13.5	-11.3
APA (%)	-0.4	-12.2
RMP (mV)	+0.6	+2.3
OS (mV)	+0.1	-8.4

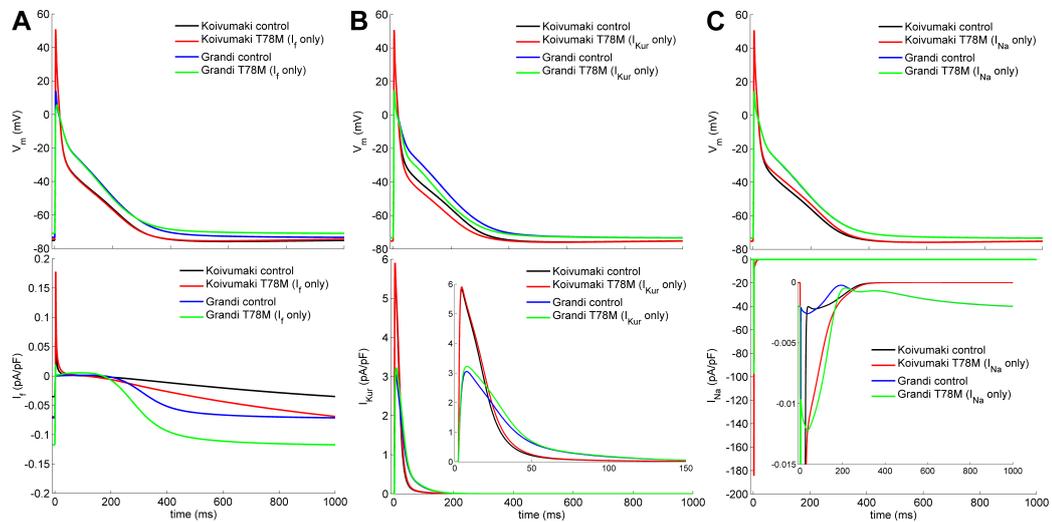
**Tabella 5.1:** Effetti simulati della mutazione T78M sulla morfologia dei potenziali d'azione dei modelli Koivumäki e Grandi.

MODELLO SAN UMANO	
CL (%)	-29.9
APD <sub>90</sub> (%)	-7.8
APA (%)	-5.3
MDP (mV)	+1.0
OS (mV)	-2.9
DDR <sub>100</sub> (%)	+92.0
V <sub>max</sub> (%)	-13.4

**Tabella 5.2:** Effetti simulati della mutazione T78M sulla morfologia del potenziale d'azione del modello di SAN umano.

Nel caso dei modelli atriali, l'effetto risultante è un pronunciato accorciamento della durata del potenziale d'azione, di entità simile in entrambi (-13.5% e -11.3% rispettivamente in Koivumäki e in Grandi). Come si può osservare dalla figura 5.17, che mostra separatamente i contributi di ciascuna corrente mutata, il principale responsabile di tale accorciamento è la corrente  $I_{Kur}$ : nel caso mutato la corrente risulta aumentata, il che si traduce in un maggiore flusso di potassio uscente dalla cellula (figura 5.17B) e, quindi, in una più rapida ripolarizzazione soprattutto nella sua fase iniziale (infatti la pendenza del "plateau triangolare" non varia, ma questo risulta "traslato" a potenziali più negativi). L'effetto di una  $I_f$  aumentata è quello di depolarizzare il valore del potenziale di riposo (qualche mV nel modello Grandi, <1 mV in Koivumäki). Le due nuove versioni dei modelli utilizzati nelle simulazioni, condividono la stessa formulazione di  $I_f$ , ma il modello

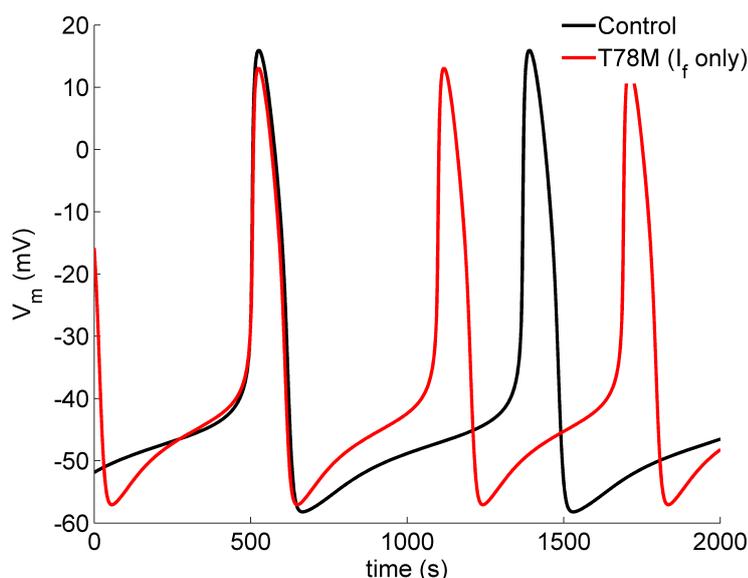
Grandi risulta più sensibile alle variazioni di questa corrente: esso infatti risente dell'aumento di  $I_f$  anche nella fase di picco del potenziale (dove  $I_f$  è uscente), che risulta abbassato (figura 5.17A). Questo determina, inoltre, l'aumento del valore di  $APD_{30}$ . Infine, una più ampia frazione di canali di sodio non inattivati per via della mutazione, produce un aumento della componente late di  $I_{Na}$  e questo agisce nel senso di prolungare la fase di ripolarizzazione del potenziale, ma l'effetto è minimo in entrambi i modelli (figura 5.17C).



**Figura 5.17:** Simulazione (a 1 Hz) della mutazione T78M della caveolina-3 nei modelli atriali Koivumäki e Grandi, separatamente per corrente ionica: A  $I_f$ , B  $I_{Kur}$  e C  $I_{Na}$ . Nei pannelli superiori è raffigurato il potenziale d'azione, mentre, in quelli inferiori, la corrente ionica sottostante.

Nel caso del modello di nodo senoatriale, l'effetto risultante principale è il cospicuo aumento di frequenza (+42.7%, ovvero -29.9% CL), dovuto principalmente alla gain of function dei canali funny. Come si può notare in figura 5.18, l'effetto della mutazione applicato unicamente alla corrente  $I_f$  spiega, da solo, con una riduzione di CL del 31.4%, il notevole aumento di frequenza. Secondariamente ed in maniera marginale, anche la gain of function dei canali del sodio

tende a ridurre il valore di CL (-0.1%): l'aumento di intensità di  $I_{Na}$  risulta, infatti, più sensibile durante la fase della depolarizzazione diastolica (viste le piccole entità delle correnti in gioco), rispetto alla fase di upstroke e di ripolarizzazione come invece accade nei modelli atriali. Contrariamente a  $I_f$  e  $I_{Na}$ , la conseguenza principale del guadagno di funzione della corrente uscente  $I_{Kur}$  è quella di un leggero prolungamento di CL (+2.6%). Tale corrente agisce soprattutto nella fase di ripolarizzazione del potenziale d'azione, ma non si annulla completamente durante la diastole: questo determina una riduzione della corrente netta diastolica, che si traduce in una minore pendenza della fase DD e, di conseguenza, nel prolungamento del cycle-length. Queste alterazioni, messe insieme, producono la variazione totale di circa -30% del valore di CL.

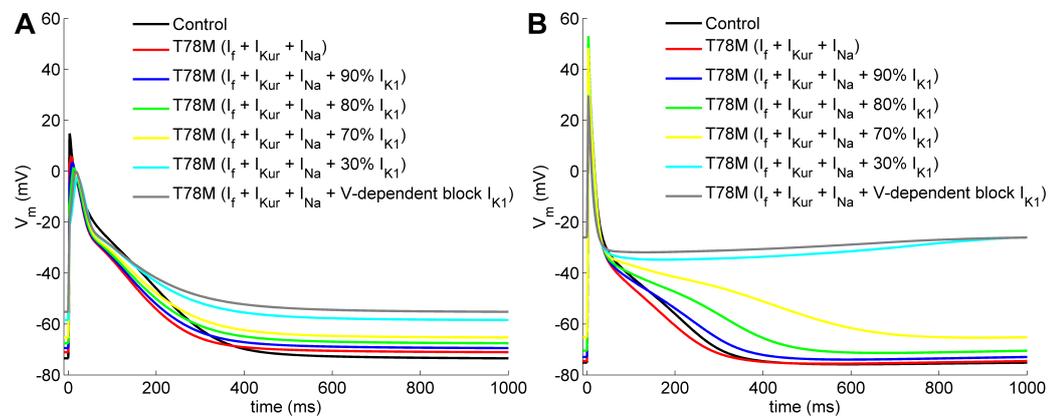


**Figura 5.18:** Simulazione del solo effetto su  $I_f$  della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello di nodo senoatriale umano.

Le riduzioni nella durata dell'AP alle varie percentuali della ripolarizzazione, nell'overshoot e nella massima velocità di upstroke (tabella 5.2) sono dovute quasi esclusivamente all'alterazione nella corrente  $I_f$  (figura 5.18), la quale, in presen-

za della mutazione, risulta aumentata anche nel tratto del potenziale d'azione in cui contribuisce come corrente uscente (sistole). Infine, la variazione del valore di MDP deriva dal diverso equilibrio che si crea tra le correnti a fine ripolarizzazione, per via delle modifiche a  $I_f$ ,  $I_{Na}$  e  $I_{Kur}$ .

La scelta di considerare nullo l'effetto della mutazione T78M sui canali Kir2.1 della corrente  $I_{K1}$  è stata presa, in primo luogo, per attenersi ad un unico set di dati provenienti dallo stesso laboratorio e, in secondo luogo, perché la non alterazione della corrente è confermata dai dati registrati su entrambi i tipi cellulari utilizzati (MEF e cardiomiociti neonatali di ratto). Ulteriore conferma viene dalla simulazione modellistica in atrio (nel SAN la corrente  $I_{K1}$  non è presente): aggiungendo, agli effetti della mutazione su  $I_f$ ,  $I_{Kur}$  e  $I_{Na}$ , anche quello su  $I_{K1}$ , modulata attraverso la curva voltage-dependent 5.11, si ottengono potenziali d'azione incompatibili con le condizioni vitali delle cellule (figura 5.19).

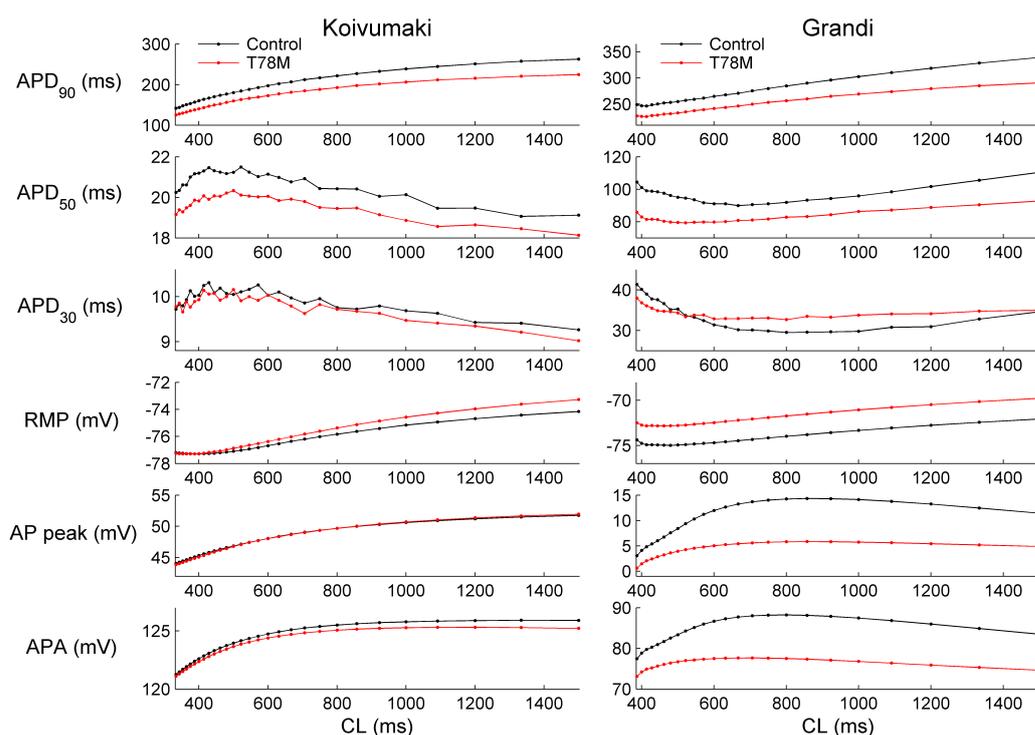


**Figura 5.19:** Simulazione (a 1 Hz), nei modelli atriali Koivumäki (A) e Grandi (B), dell'effetto modulatore sulla corrente  $I_{K1}$  in aggiunta agli effetti della mutazione T78M sulle correnti  $I_f$ ,  $I_{Kur}$  e  $I_{Na}$ .

Il potenziale di riposo e di picco risultano drasticamente alterati: il primo viene depolarizzato fino a  $\sim -55$  mV nel modello Grandi e addirittura fino a  $\sim -25$  mV nel modello Koivumäki; il secondo viene abbassato di circa una ventina di millivolt in

entrambi i modelli e, in Grandi, questo non assume nemmeno un valore positivo. Lo stesso si verifica se viene simulato un bloccaggio costante di entità simile al bloccaggio voltaggio-dipendente (riduzione del 70% della conduttanza  $g_{K1}$ ) e effetti gravi compaiono anche con riduzioni minori della conduttanza (10, 20, 30%), come si nota in figura 5.19.

Le figure 5.12 e 5.14 mostrano i potenziali d'azione atriali mutati alla frequenza basale di stimolazione di 1 Hz. Per approfondire quanto accade in atrio in funzione della frequenza di stimolo, è stato esplorato un ampio range di frequenze: 40-180 bpm. La figura 5.20 illustra tale analisi e presenta i parametri del potenziale d'azione rispetto al valore di CL espresso in millisecondi.

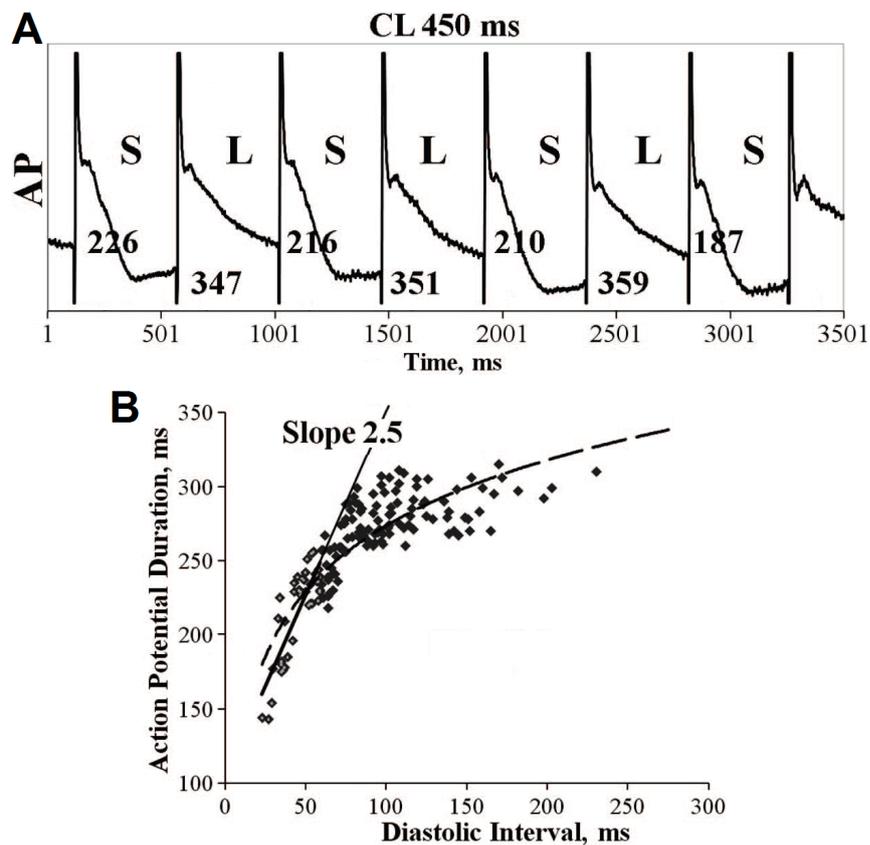


**Figura 5.20:** Analisi dei parametri del potenziale d'azione al variare della frequenza di stimolo nei modelli Koivumäki (pannelli a sinistra) e Grandi (pannelli a destra), in condizioni di controllo e mutata.

Al variare della frequenza non si nota nessuna anomalia particolare attribuibile

alla mutazione T78M. Si osserva la progressiva riduzione della durata e dell'ampiezza dell'AP al diminuire del cycle length, variazioni che si registrano anche fisiologicamente. Nella condizione mutata i parametri evolvono parallelamente a quelli nella condizione di controllo, mantenendo mediamente le differenze tra le due già viste in tabella 5.1.

Ad elevate frequenze di stimolazione, si ha la comparsa, nei cardiomiociti di lavoro, delle alternans. Le alternans sono oscillazioni nella durata del potenziale d'azione osservabili fisiologicamente: un esempio è mostrato in figura 5.21A.



**Figura 5.21:** Figura adattata da Narayan et al. [86]: A, APD-alternans registrate a 450 ms di cycle length (S, short; L, long); B, curva di APD-restitution con pendenza  $> 1$ .

Le APD-alternans appaiono di piccola ampiezza e solo a frequenze molto rapide (230 bpm) nei soggetti di controllo, di grande ampiezza e vicine alle frequenze

basali nei pazienti con fibrillazione atriale persistente, di ampiezza e a frequenze intermedie nei pazienti con fibrillazione atriale parossistica [86]. Le oscillazioni nella durata dei potenziali d'azione precedono la transizione verso la fibrillazione, che viene triggerata da un evento ectopico [86]. Così, le APD-alternans atriali possono essere un indicatore clinico di suscettibilità alla fibrillazione atriale, vista la più bassa frequenza alla quale compaiono rispetto ai soggetti sani. Inoltre, la loro inducibilità è un marker del remodelling elettrico che favorisce un substrato pro-AF. È stata quindi indagata l'insorgenza delle alternans nei modelli Koivumäki e Grandi per capire se quella mutata fosse una condizione più favorevole per il manifestarsi del fenomeno. È stato calcolato il valore del cycle length al quale si presentano le oscillazioni nel potenziale d'azione dopo 30 e dopo 300 s di pacing.

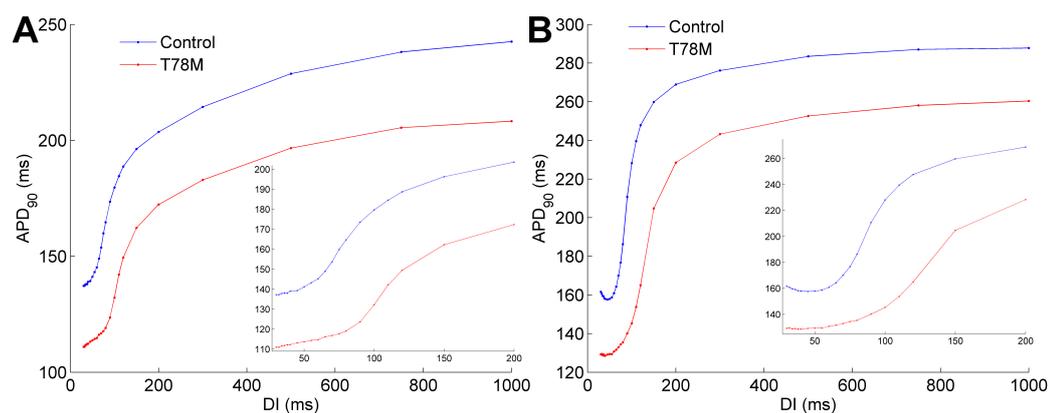
	dopo 30 s di pacing			dopo 300 s di pacing		
	CONTROL (ms)	T78M (ms)	differenza (ms)	CONTROL (ms)	T78M (ms)	differenza (ms)
KOIVUMÄKI	211	214	3	250	252	2
GRANDI	439	452	13	394	399	5

**Tabella 5.3:** Valori del cycle length ai quali si manifesta il fenomeno delle alternans nei modelli Koivumäki e Grandi, in condizioni di controllo e mutata.

Dai valori in tabella 5.3 si nota che, nella condizione mutata, le alternans compaiono ad un valore di CL maggiore rispetto al controllo, ovvero a frequenza di stimolo minore. Anche se la differenza non è elevata e all'aumentare del tempo di simulazione tale differenza tende a diminuire, il valore di 13 ms nel modello Grandi è comunque interessante e può indicare una maggiore instabilità del potenziale d'azione nel caso mutato.

Infine sono state ricavate le curve di restituzione della durata del potenziale d'azione tramite la simulazione del protocollo S1-S2. Con S1-S2 si indica l'applicazione di un treno di stimoli che si succedono ad intervalli regolari a frequenza

basale (1 Hz), seguiti da un extra-stimolo S2 uguale ai precedenti, ma a distanza variabile dall'ultimo S1. Si osservano le proprietà dell'extra-AP al variare della distanza S1-S2 o, meglio, dell'intervallo diastolico DI (definito come la differenza tra la distanza S1-S2 e il valore dell'APD<sub>90</sub> del potenziale corrispondente all'ultimo stimolo S1). Il valore della pendenza massima nel tratto iniziale della curva è indicativo della stabilità/instabilità del sistema: secondo la cosiddetta ipotesi della restituzione, un fattore determinante dell'alterazione dell'andamento dell'onda degli AP, che conduce alla fibrillazione, è una più ripida curva di restituzione, in cui piccoli cambiamenti nell'intervallo diastolico possono produrre grandi fluttuazioni nell'APD e nella refrattarietà [86]. È stato visto che, se la pendenza della funzione di restituzione a brevi DI (cioè ad alte frequenze cardiache) supera l'unità, si verificano alternans nell'APD che promuovono la destabilizzazione del potenziale d'azione (figura 5.21B). L'appiattimento della curva di restituzione diminuisce l'ampiezza delle alternans ed ha dimostrato di avere un effetto anti-fibrillatorio in vitro [86]. La figura 5.22 mostra le curve di APD<sub>90</sub>-restitution ottenute dai modelli Koivumäki e Grandi: in esse non si osservano significative variazioni indotte dalla mutazione rispetto al controllo.



**Figura 5.22:** Curve di APD<sub>90</sub>-restitution ottenute dai modelli Koivumäki (A) e Grandi (B), in condizioni di controllo e mutata.

In conclusione, i risultati ottenuti simulando la mutazione T78M nei modelli matematici di potenziale d'azione atriale e del nodo del seno sono in linea con i fenotipi riscontrati nei pazienti portatori di a tale mutazione. Nel nodo del seno aumenta la pendenza della fase diastolica determinando l'aumento della frequenza in modo congruente con un fenotipo tachicardico o tachiaritmico, come la tachicardia sinusale inappropriata; inoltre si accorcia l'APD e si eleva l'MDP, effetti che rendono più suscettibile il potenziale d'azione ad una maggiore instabilità. Nelle cellule atriali l'accorciamento dell'APD fa diminuire il periodo refrattario ed è congruente con i fenotipi tachiaritmici. Inoltre, una APD ridotta rende l'AP più vulnerabile a fenomeni quali le alternans che si verificano nei cardiomiociti all'aumentare della frequenza (tachicardia) e possono triggerare la fibrillazione atriale. Complessivamente si può affermare che la mutazione T78M della caveolina-3 offre un substrato pro-aritmico, che può risultare ancora più evidente a livello di tessuto anziché di singola cellula. Infine, dalle simulazioni, si è trovato che la mutazione T78M è di tipo gain of function su tutti i canali ionici in gioco e ciò indica come la caveolina e le caveole siano fondamentali per il corretto funzionamento elettrico (oltre che strutturale) delle cellule cardiache in condizioni fisiologiche; ma non solo, perché le simulazioni permettono di stabilire che il contributo principale al fenotipo mutato è dato, nel nodo del seno, da  $I_f$  e, nei cardiomiociti atriali, da  $I_{Kur}$ . Queste correnti si possono considerare, a livello di espressione, tessuto-specifiche, in quanto quasi esclusivamente espresse l'una nelle cellule senoatriali, l'altra nei cardiomiociti atriali di lavoro. Mentre  $I_f$  è da tempo riconosciuta come bersaglio di farmaci nei casi di disfunzioni del SAN, questa esclusività rende la corrente  $I_{Kur}$  una possibile candidata come target farmacologico nei casi di IST e AF in presenza della mutazione T78M della caveolina.

# Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi sono stati perseguiti parallelamente due obiettivi: il primo era quello di sviluppare il primo modello matematico di potenziale d'azione di nodo senoatriale umano, mentre il secondo era quello di stabilire il collegamento esistente tra la mutazione T78M della proteina caveolina-3 e le patologie aritmogene ad essa associate. Tali obiettivi sono stati, alla fine, integrati in uno unico, ovvero l'utilizzo dei modelli matematici di potenziale d'azione atriale (di cellule specializzate e non specializzate) per l'interpretazione dei dati sperimentali e la comprensione dei meccanismi di azione relativi alla mutazione in esame. Il modello di potenziale d'azione pacemaker umano è stato sviluppato a partire dalla struttura di base del modello Severi et al. di AP di cellula SAN di coniglio [109] (in quanto modello SAN più aggiornato) ed è stato modificato e validato basandosi sui dati in letteratura ottenuti da esperimenti su cellule di nodo senoatriale umano [22, 28, 126, 130, 131]. La presenza di un numero limitato di lavori pubblicati su cellule di nodo senoatriale umano dipende dal fatto che i cuori espantati ottenuti durante i trapianti cardiaci, che costituiscono la maggiore fonte di miociti umani, non contengono la regione del nodo del seno, perché questa è solitamente lasciata nella propria sede nel torace del ricevente. Nonostante i dati disponibili non permettano di aggiornare le formulazioni dell'intero set di correnti ioniche espresse in cellule SAN, il modello risultante genera un potenziale d'azione la cui morfologia riproduce fedelmente quella registrata (figura 4.11) e i cui parametri

sono in accordo con quelli riportati sperimentalmente (tabella 4.3). Inoltre, anche l'andamento del transiente di calcio intracellulare riprodotto è in linea con il tracciato sperimentale (figura 4.13). Il modello sviluppato è stato successivamente testato sugli effetti indotti dalle mutazioni geniche dei canali ionici descritte nel capitolo 3: i risultati sono complessivamente in buon accordo nei casi di mutazioni delle correnti  $I_f$  e  $I_{Na}$ , mentre lo sono meno nei restanti casi. La validazione su questo tipo di dati è effettuata sul valore della frequenza cardiaca, al quale, però, non è possibile riferirsi in maniera assoluta, in quanto il passaggio dal potenziale d'azione di singola cellula agli eventi elettrici macroscopici del cuore (per esempio il tracciato elettrocardiografico) è molto complesso: va considerato che le dinamiche che, in condizioni patologiche, determinano il valore della frequenza cardiaca dipendono dall'interazione di numerosi fattori e dall'attuarsi di possibili meccanismi compensatori che difficilmente possono essere previsti e descritti a livello di singola cellula (primo tra tutti la regolazione del sistema nervoso autonomo). Nonostante queste limitazioni (valide per ogni modello), il comportamento del modello sviluppato in questo lavoro è in ottimo accordo con le evidenze sperimentali e può essere considerato un discreto punto di partenza per ulteriori sviluppi nei casi in cui ulteriori dati sperimentali diventino disponibili. Nel frattempo, il suo impiego nella simulazione può comunque fornire indicazioni utili e suggerimenti per ulteriori approfondimenti nell'ambito dello studio dei meccanismi di generazione e modulazione della ritmicità cardiaca nell'uomo.

Per quanto riguarda la mutazione T78M della caveolina-3, è stato scoperto, dall'analisi dei dati in possesso e di quelli presenti in letteratura, che induce effetti di tipo *gain of function* sui canali ionici relativi alle correnti  $I_f$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Na}$ , evidenziando come la caveolina e le caveole siano implicate nel corretto funzionamento fisiologico delle cellule cardiache. Dalle simulazioni è emerso che nel nodo seno-atriale aumenta la pendenza della fase diastolica e ciò determina l'incremento

della frequenza (figura 5.16); inoltre, si accorcia la durata del potenziale d'azione e si eleva il massimo potenziale diastolico, effetti che rendono più suscettibile il potenziale d'azione ad una maggiore instabilità. Il contributo principale al fenotipo mutato è dato, in questo caso, dalla gain of function della corrente  $I_f$ . Nelle cellule atriali, invece, l'accorciamento della durata del potenziale d'azione (figure 5.12 e 5.14), riducendo il periodo refrattario, è congruente con i fenotipi tachiaritmici e con una maggiore vulnerabilità a fenomeni quali le APD-alternans che si verificano nei cardiomiociti all'aumentare della frequenza. L'effetto predominante, che determina il fenotipo mutato, è dato dalla corrente  $I_{Kur}$ . Tali risultati sono in linea con i fenotipi riscontrati nei pazienti, principalmente fibrillazione atriale e tachicardia sinusale e indicano come la mutazione T78M della caveolina-3 determini un substrato pro-aritmico, che può risultare ancora più evidente a livello di tessuto anziché di singola cellula. Inoltre, le correnti che, dalle simulazioni, sono risultate maggiormente responsabili del fenotipo mutato ( $I_f$  e  $I_{Kur}$ ), si possono considerare, a livello di espressione, tessuto-specifiche, in quanto quasi esclusivamente espresse l'una nelle cellule senoatriali, l'altra nei cardiomiociti atriali di lavoro. Mentre la prima è da tempo riconosciuta come bersaglio di farmaci nei casi di disfunzioni del nodo senoatriale, l'esclusività dell'espressione di  $I_{Kur}$  nel tessuto atriale la rende una possibile candidata come target farmacologico nei casi di tachiaritmie associate alla mutazione T78M della caveolina-3.

In conclusione, i modelli matematici di potenziale d'azione si configurano come strumenti per un'approfondita interpretazione dei dati (per esempio nelle situazioni di variabilità nei valori riportati) e di supporto alla comprensione delle relazioni causa-effetto in seguito alla variazione di uno o più parametri (come nei casi di simulazione di effetti patologici). Tramite essi, inoltre, è possibile eseguire simulazioni sulla propagazione del potenziale d'azione (accoppiando elettricamente le cellule tra loro e facendo assunzioni sulla dimensionalità del problema) e studia-

re, in questo modo, anche le patologie che determinano anomalie nella conduzione del potenziale d'azione. Oltre a questo, la modellistica computazionale ha un ruolo importante nel campo della ricerca, suggerendone la direzione di sviluppo. La modellistica atriale, di cellula specializzata e non specializzata, può, quindi, contribuire notevolmente ad una migliore comprensione della fisiologia e pato-fisiologia atriale: il suo forte sviluppo è, infatti, stimolato dalla potenziale applicazione nel processo di diagnosi e pianificazione di interventi terapeutici.

# Appendice A

## Software impiegati

Durante questo lavoro di tesi sono stati impiegati i software COR e MATLAB<sup>®</sup>: il primo nell'implementazione e simulazione del modello di potenziale d'azione di nodo senoatriale umano (per la sua semplicità di utilizzo e perché il modello di partenza era già implementato tramite questo software); il secondo nelle operazioni di fitting ai minimi quadrati dei dati sperimentali, nella simulazione dei modelli di potenziale d'azione atriali (in quanto il loro codice era disponibile in questa versione) e nell'elaborazione dei risultati.

Il software COR (*Cellular Open Resource*) [2] è stato sviluppato da Alan Garny nel 2003 per modellare funzioni biologiche tramite il formato CellML, il quale ha lo scopo di semplificare e promuovere lo scambio di modelli biologici. CellML (*Cellular Mark-up Language*) è basato sul metalinguaggio XML (*eX-tensible Mark-up Language*), utilizzato per definire nuovi linguaggi allo scopo di creare documenti conformi ad una struttura specifica e ben definita. Nel caso di CellML, le specifiche della struttura sintattica sono state rilasciate per la prima volta nel 2001 dai ricercatori che lo hanno sviluppato e, successivamente, in forma aggiornata nel 2006. Il formato CellML può essere utilizzato in abbinamento a diverse tipologie di software, utili per creare agevolmente nuovi modelli, visua-

lizzare l'andamento delle simulazioni o compilare un modello in un programma eseguibile. Tra le caratteristiche principali del formato, vi è la necessità di attribuire, ad ogni parametro creato (sia esso variabile o costante), un'unità di misura fisica (o l'adimensionalità del parametro): il controllo sulla validità dimensionale delle equazioni sviluppate è demandato allo specifico software. Un'ulteriore caratteristica che distingue CellML è lo sviluppo dei modelli tramite compartimenti e collegamenti: è possibile definire dei gruppi che raccolgono una specifica serie di variabili ed equazioni correlate in senso logico, per poi definire le mappe dei collegamenti tra un compartimento e l'altro. Tramite il software COR è possibile manipolare direttamente il modello in CellML in maniera trasparente e user-friendly per l'utente: nella fase di editing l'interfaccia grafica del programma mostra le linee di codice del modello e visualizza la linea selezionata esprimendo, in modo diretto, la variabile o l'equazione che rappresenta. Terminato l'editing del modello, questo deve essere validato: il software esegue un controllo dettagliato sulle equazioni allo scopo di identificare errori di sintassi o inconsistenze nelle semplificazioni delle unità di misura. L'interfaccia, in fase di simulazione, mostra l'elenco delle costanti e delle variabili del modello ed i parametri della simulazione (durata, passo ed algoritmo di integrazione numerica) ed ha una sezione predisposta per la visualizzazione dell'andamento, durante la simulazione, delle variabili selezionate tra quelle dell'elenco (tramite checkbox).

MATLAB<sup>®</sup> (abbreviazione di *MATrix LABoratory*) è un ambiente per il calcolo numerico e l'analisi statistica, scritto in C, che comprende anche l'omonimo linguaggio di programmazione ideato dalla MathWorks [4]. Creato alla fine degli anni '70 da Cleve Moler, esso permette di risolvere problemi numerici senza che sia necessario scrivere esplicitamente una procedura in un linguaggio di programmazione ad alto livello. MATLAB si basa sul calcolo matriciale e si può pensare ad esso come un sistema efficace per accedere ad una libreria di procedure di

calcolo numerico molto sofisticate, con in più la possibilità di rappresentare graficamente i risultati. L'interfaccia del programma è composta da diverse finestre: Command Window (finestra nella quale è possibile digitare i comandi supportati), Workspace (spazio di lavoro contenente le variabili dichiarate), Current directory (che mostra il contenuto della cartella corrente) e Command history (contenente lo storico dei comandi digitati). Un singolo comando digitato nella Command Window permette di risolvere problemi complessi (ad esempio l'inversione di una matrice) e una successione di comandi può essere raccolta in un file ed essere eseguita richiamando il nome del file stesso. Inoltre, è possibile definire funzioni che forniscano valori in uscita, in modo che MATLAB risulti esso stesso programmabile, permettendo, così, operazioni più elaborate come visualizzare funzioni e dati, implementare algoritmi, creare interfacce utente. MATLAB è usato da milioni di persone nell'industria e nelle università per via dei suoi numerosi tool aggiuntivi a supporto dei più disparati campi di studio e applicazione.



# Bibliografia

- [1] **Applied Biosystems**<sup>®</sup> 7900HT Fast Real-Time PCR System. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4329001>.
- [2] **COR** (Cellular Open Resource). <http://cor.physiol.ox.ac.uk/>.
- [3] **Invitrogen**<sup>™</sup> SuperScript Reverse Transcriptase. <http://www.lifetechnologies.com/it/en/home/brands/product-brand/superscript.html>.
- [4] **MATLAB**<sup>®</sup> MATrix LABoratory. versione 8.0.0.783 (r2012b), the mathworks inc., natick, massachusetts, united states. <http://www.mathworks.it>.
- [5] **Qiagen**<sup>®</sup> RNeasy Micro Kit. <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/total-rna/rneasy-micro-kit>.
- [6] **Abbott G. W., Sesti F., Splawski I., Buck M. E., Lehmann M. H., Timothy K. W., Keating M. T., Goldstein S. A.** MiRP1 forms I<sub>Kr</sub> potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, 97(2):175–187, 1999.

- [7] **Abriel H., Wehrens X. H., Benhorin J., Kerem B., Kass R. S.** Molecular pharmacology of the sodium channel mutation D1790G linked to the long-QT syndrome. *Circulation*, 102(8):921–925, 2000.
- [8] **Aidery P., Kisselbach J., Schweizer P. A., Becker R., Katus H. A., Thomas D.** Impaired ion channel function related to a common KCNQ1 mutation - implications for risk stratification in long QT syndrome 1. *Gene*, 511(1):26–33, 2012.
- [9] **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 5th edition, 2007.
- [10] **Altomare C., Terragni B., Brioschi C., Milanesi R., Pagliuca C., Viscomi C., Moroni A., Baruscotti M., DiFrancesco D.** Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol*, 549(2):347–359, 2003.
- [11] **An R. H., Bangalore R., Rosero S. Z., Kass R. S.** Lidocaine block of LQT-3 mutant human Na<sup>+</sup> channels. *Circ Res*, 79(1):103–108, 1996.
- [12] **An R. H., Wang X. L., Kerem B., Benhorin J., Medina A., Goldmit M., Kass R. S.** Novel LQT-3 mutation affects Na<sup>+</sup> channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circ Res*, 83(2):141–146, 1998.
- [13] **Baig S. M., Koschak A., Lieb A., Gebhart M., Dafinger C., Nürnberg G., Ali A., Ahmad I., Sinnegger-Brauns M. J., Brandt N., Engel J., Mangoni M. E., Farooq M., Khan H. U., Nürnberg P., Striessnig J., Bolz H. J.** Loss of Ca<sub>v</sub>1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci*, 14(1):77–84, 2011.

- [14] **Barbuti A., Baruscotti M., DiFrancesco D.** The pacemaker current: from basics to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 18(3):342–347, 2007.
- [15] **Baroudi G., Chahine M.** Biophysical phenotypes of SCN5A mutations causing long QT and Brugada syndromes. *FEBS Lett*, 487(2):224–228, 2000.
- [16] **Bartos D. C., Duchatelet S., Burgess D. E., Klug D., Denjoy I., Peat R., Lupoglazoff J. M., Fressart V., Berthet M., Ackerman M. J., January C. T., Guicheney P., Delisle B. P.** R231C mutation in KCNQ1 causes long QT syndrome type 1 and familial atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 8(1):48–55, 2011.
- [17] **Benson D. W., Wang D. W., Dyment M., Knilans T. K., Fish F. A., Strieper M. J., Rhodes T. H., George A. L. Jr.** Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest*, 112(7):1019–1028, 2003.
- [18] **Bezzina C., Veldkamp M. W., van Den Berg M. P., Postma A. V., Rook M. B., Viersma J. W., van Langen I. M., Tan-Sindhunata G., Bink-Boelkens M. T., van Der Hout A. H., Mannens M. M., Wilde A. A.** A single Na<sup>+</sup> channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*, 85(12):1206–1213, 1999.
- [19] **Boineau J. P., Canavan T. E., Schuessler R. B., Cain M. E., Corr P. B., Cox J. L.** Demonstration of a widely distributed atrial pacemaker complex in the human heart. *Circulation*, 77(6):1221–1237, 1988.
- [20] **Boyett M. R., Honjob H., Kodamab I.** The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res*, 47(4):658–687, 2000.

- [21] **Burgess D. E., Bartos D. C., Reloj A. R., Campbell K. S., Johnson J. N., Tester D. J., Ackerman M. J., Fressart V., Denjoy I., Guicheney P., Moss A. J., Ohno S., Horie M., Delisle B. P.** High-risk long QT syndrome mutations in the K<sub>v</sub>7.1 (KCNQ1) pore disrupt the molecular basis for rapid K<sup>+</sup> permeation. *Biochemistry*, 51(45):9076–9085, 2012.
- [22] **Chandler N. J., Greener I. D., Tellez J. O., Inada S., Musa H., Molenaar P., Difrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R. H., Billeter R., Sharma V., Sigg D. C., Boyett M. R., Dobrzynski H.** Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation*, 119(12):1562–1575, 2009.
- [23] **Chandra R., Starmer C. F., Grant A. O.** Multiple effects of KPQ deletion mutation on gating of human cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in mammalian cells. *Am J Physiol*, 274(5):H1643–H1654, 1998.
- [24] **Chen Y. H., Xu S. J., Bendahhou S., Wang X. L., Wang Y., Xu W. Y., Jin H. W., Sun H., Su X. Y., Zhuang Q. N., Yang Y. Q., Li Y. B., Liu Y., Xu H. J., Li X. F., Ma N., Mou C. P., Chen Z., Barhanin J., Huang W.** KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science*, 299(5604):251–254, 2003.
- [25] **Clancy C. E., Kass R. S.** Inherited and acquired vulnerability to ventricular arrhythmias: cardiac Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels. *Physiol Rev*, 85(1):33–47, 2005.
- [26] **Courtemanche M., Ramirez R. J., Nattel S.** Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am J Physiol*, 275(1):H301–H321, 1998.

- [27] **Cronk L. B., Ye B., Kaku T., Tester D. J., Vatta M., Makielski J. C., Ackerman M. J.** Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm*, 4(2):161–166, 2007.
- [28] **Danielsson C., Brask J., Scöld A. C., Genead R., Andersson A., Andersson U., Stockling K., Pehrson R., Grinnemo K. H., Salari S., Hellmold H., Danielsson B., Sylvén C., Elinder F.** Exploration of human, rat, and rabbit embryonic cardiomyocytes suggests K-channel block as a common teratogenic mechanism. *Cardiovasc Res*, 97(1):23–32, 2013.
- [29] **Deschênes I., Baroudi G., Berthet M., Barde I., Chalvidan T., Denjoy I., Guicheney P., Chahine M.** Electrophysiological characterization of SCN5A mutations causing long QT (E1784K) and Brugada (R1512W and R1432G) syndromes. *Cardiovasc Res*, 46(1):55–65, 2000.
- [30] **DiFrancesco D., Noble D.** A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 307(1133):353–398, 1985.
- [31] **DiFrancesco D., Tromba C.** Inhibition of the hyperpolarization-activated current ( $I_f$ ) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol*, 405:477–491, 1988.
- [32] **Dobrev D.** Ion channel portrait of the human sinus node: useful for a better understanding of sinus node function and dysfunction in humans? *Circulation*, 119:1556–1558, 2009.
- [33] **Dobrzynski H., Boyett M. R., Anderson R. H.** New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation*, 115(14):1921–1932, 2007.

- [34] **Dössel O., Krueger M. W., Weber F. M., Wilhelms M., Seemann G.** Computational modeling of the human atrial anatomy and electrophysiology. *Med Biol Eng Comput*, 50(8):773–799, 2012.
- [35] **Drouin E.** Electrophysiologic properties of the adult human sinus node. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 8:254–258, 1997.
- [36] **Duhme N., Schweizer P. A., Thomas D., Becker R., Schröter J., Barends T. R., Schlichting I., Draguhn A., Bruehl C., Katus H. A., Koenen M.** Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation. *Eur Heart J*, 34(35):2768–2775, 2013.
- [37] **Dumaine R., Wang Q., Keating M. T., Hartmann H. A., Schwartz P. J., Brown A. M., Kirsch G. E.** Multiple mechanisms of Na<sup>+</sup> channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res*, 78(5):916–924, 1996.
- [38] **Es-Salah-Lamoureux Z., Xiong P. Y., Goodchild S. J., Ahern C. A., Fedida D.** Blockade of permeation by potassium but normal gating of the G628S nonconducting hERG channel mutant. *Biophys J*, 101(3):662–670, 2011.
- [39] **Fermini B., Nathan R. D.** Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 260(2):H735–H743, 1991.
- [40] **Gazzerro E., Sotgia F., Bruno C., Lisanti M. P., Minetti C.** Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet*, 18(2):137–145, 2010.
- [41] **Gluzman Y.** SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1):175–182, 1981.

- [42] **Graham F. L., Smiley J., Russell N. C., Naim B.** Characteristics of a human cell line transformed by a DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36:59–74, 1977.
- [43] **Grandi E., Pandit S. V., Voigt N., Workman A. J., Dobrev D., Jalife J., Bers D. M.** Human atrial action potential and  $\text{Ca}^{2+}$  model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Circ Res*, 109(9):1055–1066, 2011.
- [44] **Grandi E., Pasqualini F. S., Bers D. M.** A novel computational model of the human ventricular action potential and  $\text{Ca}^{2+}$  transient. *J Mol Cell Cardiol*, 48(1):112–121, 2010.
- [45] **Grant A. O., Carboni M. P., Neplioueva V., Starmer C. F., 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*, 110(8):1201–1209, 2002.
- [46] **Groenewegen W. A., Firouzi M., Bezzina C. R., Vliex S., van Langen I. M., Sandkuijl L., Smits J. P., Hulsbeek M., Rook M. B., Jongasma H. J., Wilde A. A.** A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res*, 92(1):14–22, 2003.
- [47] **Hagiwara N., Irisawa H., Kameyama M.** Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*, 395:233–253, 1988.
- [48] **Henrion U., Zumhagen S., Steinke K., Strutz-Seebohm N., Stallmeyer B., Lang F., Schulze-Bahr E., Seebohm G.** Overlapping cardiac phenotype associated with a familial mutation in the voltage sensor of the KCNQ1 channel. *Cell Physiol Biochem*, 29(5-6):809–818, 2012.

- [49] **Hodgkin A. L., Huxley A. F.** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4):500–544, 1952.
- [50] **Hong K., Piper D. R., Diaz-Valdecantos A., Brugada J., Oliva A., Burashnikov E., Santos-de-Soto J., Grueso-Montero J., Diaz-Enfante E., Brugada P., Sachse F., Sanguinetti M. C., Brugada R.** De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res*, 68(3):433–440, 2005.
- [51] **Howerton K., Schlaepfer D. D., Ilic D.** Cell lines from mouse embryos with early embryonic lethality. *Cell Commun Adhes*, 15(4):379–383, 2008.
- [52] **Huang F. D., Chen J., Lin M., Keating M. T., Sanguinetti M. C.** Long-QT syndrome-associated missense mutations in the pore helix of the HERG potassium channel. *Circulation*, 104(9):1071–1075, 2001.
- [53] **Huttner I. G., Trivedi G., Jacoby A., Mann S. A., Vandenberg J. I., Fatkin D.** A transgenic zebrafish model of a human cardiac sodium channel mutation exhibits bradycardia, conduction-system abnormalities and early death. *J Mol Cell Cardiol*, 61:123–132, 2013.
- [54] **James T. N., Sherf L., Fine G., Morales A. R.** Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. *Circulation*, 34(1):139–163, 1966.
- [55] **Jose A. D., Collison D.** The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res*, 4:160–167, 1970.
- [56] **Joung B., Ogawa M., Lin S. F., Chen P. S.** The calcium and voltage clocks in sinoatrial node automaticity. *Korean Circ J*, 39(3):217–222, 2009.

- [57] **Kawano S., Hiraoka M.** Transient outward currents and action potential alterations in rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 23(6):681–693, 1991.
- [58] **Kawashima T., Sasaki H.** The morphological significance of the human sinuatrial nodal branch (artery). *Heart Vessels*, 18(4):213–219, 2003.
- [59] **Keith A., Flack M.** The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart. *J Anat Physiol*, 41(3):172–189, 1907.
- [60] **Ki C. S., Jung C. L., Kim H. J., Baek K. H., Park S. J., On Y. K., Kim K. S., Noh S. J., Youm J. B., Kim J. S., Cho H.** A KCNQ1 mutation causes age-dependant bradycardia and persistent atrial fibrillation. *Pflugers Arch*, 466(3):529–540, 2013.
- [61] **Koivumäki J. T., Korhonen T., Tavi P.** Impact of sarcoplasmic reticulum calcium release on calcium dynamics and action potential morphology in human atrial myocytes: a computational study. *PLoS Comput Biol*, 7(1):1–14, 2011.
- [62] **Kyndt F., Probst V., Potet F., Demolombe S., Chevallier J. C., Baro I., Moisan J. P., Boisseau P., Schott J. J., Escande D., Le Marec H.** Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*, 104(25):3081–3086, 2001.
- [63] **Laish-Farkash A., Glikson M., Brass D., Marek-Yagel D., Pras E., Dascal N., Antzelevitch C., Nof E., Reznik H., Eldar M., Luria D.** A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 21(12):1365–1372, 2010.

- [64] **Lakatta E. G., DiFrancesco D.** What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *J Mol Cell Cardiol*, 47:157–170, 2009.
- [65] **Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., Levine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J. P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L. W., McPherson J. D., Marra M. A., Mardis E. R., Fulton L. A., Chinwalla A. T., Pepin K. H., Gish W. R., Chissoe S. L., Wendl M. C., Delehaunty K. D., Miner T. L., Delehaunty A., Kramer J. B., Cook L. L., Fulton R. S., Johnson D. L., Minx P. J., Clifton S. W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J. F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R. A., Muzny D. M., Scherer S. E., Bouck J. B., Sodergren E. J., Worley K. C., Rives C. M., Gorrell J. H., Metzker M. L., Naylor S. L., Kucherlapati R. S., Nelson D. L., Weinstock G. M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D. R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M.,**

Weinstock K., Lee H. M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R. W., Federspiel N. A., Abola A. P., Proctor M. J., Myers R. M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D. R., Olson M. V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G. A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B. A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W. R., de la Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J. A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D. G., Burge C. B., Cerutti L., Chen H. C., Church D., Clamp M., Copley R. R., Doerks T., Eddy S. R., Eichler E. E., Furey T. S., Galagan J., Gilbert J. G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L. S., Jones T. A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W. J., Kitts P., Koonin E. V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T. M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J. V., Mulder N., Pollara V. J., Ponting C. P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A. F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y. I., Wolfe K. H., Yang S. P., Yeh R. F., Collins F., Guyer M. S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K. A., Patrinos A., Morgan M. J., de Jong P., Catanese J. J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*, 409:860–921, 2001.

- [66] **Lei M., Brown H. F.** Two components of the delayed rectifier potassium current,  $I_K$ , in rabbit sino-atrial node cells. *Exp Physiol*, 81(5):725–741, 1996.

- [67] **Lei M., Cooper P. J., Camelliti P., Kohl P.** Role of the 293b-sensitive, slowly activating delayed rectifier potassium current,  $I_{Ks}$ , in pacemaker activity of rabbit isolated sino-atrial node cells. *Cardiovasc Res*, 53(1):68–79, 2002.
- [68] **Lei M., Zhang H., Grace A. A., Huang C. L.** SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc Res*, 74(3):356–365, 2007.
- [69] **Lenaerts I., Bito V., Heinzl F. R., Driesen R. B., Holemans P., D’hooge J., Heidbüchel H., Sipido K. R., Willems R.** Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between  $Ca^{2+}$  influx and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ Res*, 105(9):876–885, 2009.
- [70] **Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J.** *Molecular Cell Biology*. Freeman, W. H. & Company, 5th edition, 2003.
- [71] **Lu Y., Mahaut-Smith M. P., Huang C. L., Vandenberg J. I.** Mutant MiRP1 subunits modulate HERG  $K^+$  channel gating: a mechanism for proarrhythmia in long QT syndrome type 6. *J Physiol*, 551(1):253–262, 2003.
- [72] **Luo M., Anderson M. E.** Mechanisms of altered  $Ca^{2+}$  handling in heart failure. *Circ Res*, 113(6):690–708, 2013.
- [73] **Lupoglazoff J. M., Denjoy I., Villain E., Fressart V., Simon F., Bozio A., Berthet M., Benammar N., Hainque B., Guicheney P.** Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol*, 43(5):826–830, 2004.

- [74] **Makita N., Sasaki K., Groenewegen W. A., Yokota T., Yokoshiki H., Murakami T., Tsutsui H.** Congenital atrial standstill associated with coinheritance of a novel SCN5A mutation and connexin 40 polymorphisms. *Heart Rhythm*, 2(10):1128–1134, 2005.
- [75] **Makiyama T., Akao M., Tsuji K., Doi T., Ohno S., Takenaka K., Kobori A., Ninomiya T., Yoshida H., Takano M., Makita N., Yanagisawa F., Higashi Y., Takeyama Y., Kita T., Horie M.** High risk for bradyarrhythmic complications in patients with Brugada syndrome caused by SCN5A gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 46(11):2100–2106, 2005.
- [76] **Maleckar M. M., Greenstein J. L., Giles W. R., Trayanova N. A.** K<sup>+</sup> current changes account for the rate dependence of the action potential in the human atrial myocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(4):H1398–H1410, 2009.
- [77] **Maltsev V. A., Lakatta E. G.** Synergism of coupled subsarcolemmal Ca<sup>2+</sup> clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296(3):H594–H615, 2009.
- [78] **Marionneau C., Couette B., Liu J., Li H., Mangoni M. E., Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S.** Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*, 562:223–234, 2005.
- [79] **Masson-Pévet M., Gros D., Besselsen E.** The caveolae in rabbit sinus node and atrium. *Cell Tissue Res*, 208(2):183–196, 1980.

- [80] **Milanesi R., Baruscotti M., Gnecci-Ruscione T., DiFrancesco D.** Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med*, 354(2):151–157, 2006.
- [81] **Molenda N. A.** Alternative splicing of calcium channel  $Ca_v1.1$ . *University of Ulm*, 2007.
- [82] **Monfredi O., Dobrzynski H., Mondal T., Boyett M. R., Morris G. M.** The anatomy and physiology of the sinoatrial node - a contemporary review. *Pacing Clin Electrophysiol*, 33(11):1392–1406, 2010.
- [83] **Nagatomo T., Fan Z., Ye B., Tonkovich G. S., January C. T., Kyle J. W., Makielski J. C.** Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ  $Na^+$  channels. *Am J Physiol*, 275(6):H2016–H2024, 1998.
- [84] **Nakayama T., Kurachi Y., Noma A., Irisawa H.** Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart. *Pflugers Arch*, 402(3):248–257, 1984.
- [85] **Napolitano C., Antzelevitch C.** Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ Res*, 108(5):607–618, 2011.
- [86] **Narayan S. M., Franz M. R., Clopton P., Pruvot E. J., Krummen D. E.** Repolarization alternans reveals vulnerability to human atrial fibrillation. *Circulation*, 123(25):2922–2930, 2011.
- [87] **Nawathe P. A., Kryukova Y., Oren R. V., Milanesi R., Clancy C. E., Lu J. T., Moss A. J., DiFrancesco D., Robinson R. B.** An LQTS6 MiRP1 mutation suppresses pacemaker current and is associated with sinus bradycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 24(9):1021–1027, 2013.

- [88] **Netter M. F., Zuzarte M., Schlichthörl G., Klöcker N., Decher N.** The HCN4 channel mutation D553N associated with bradycardia has a C-linker mediated gating defect. *Cell Physiol Biochem*, 30(5):1227–1240, 2012.
- [89] **Nguyen T. P., Wang D. W., Rhodes T. H., George A. L. Jr.** Divergent biophysical defects caused by mutant sodium channels in dilated cardiomyopathy with arrhythmia. *Circ Res*, 102(3):364–371, 2008.
- [90] **Nilius B.** Possible functional significance of a novel type of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Biomed Biochim Acta*, 45(8):K37–K45, 1986.
- [91] **Niu D. M., Hwang B., Hwang H. W., Wang N. H., Wu J. Y., Lee P. C., Chien J. C., Shieh R. C., Chen Y. T.** A common SCN5A polymorphism attenuates a severe cardiac phenotype caused by a nonsense SCN5A mutation in a Chinese family with an inherited cardiac conduction defect. *J Med Genet*, 43(10):817–821, 2006.
- [92] **Noble D., DiFrancesco D., Denyer J. C.** *Ionic mechanisms in normal and abnormal cardiac pacemaker activity.* In: *Neuronal and Cellular Oscillators*, ed. Jacklet JW, 1989.
- [93] **Nof E., Luria D., Brass D., Marek D., Lahat H., Reznik-Wolf H., Pras E., Dascal N., Eldar M., Glikson M.** Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*, 116(5):463–470, 2007.
- [94] **Nygren A., Fiset C., Firek L., Clark J. W., Lindblad D. S., Clark R. B., Giles W. R.** Mathematical model of an adult human atrial cell: the role of  $\text{K}^+$  currents in repolarization. *Circ Res*, 82(1):63–81, 1998.

- [95] **Okamoto T., Schlegel A., Scherer P. E., Lisanti M. P.** Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 273(10):5419–5422, 1998.
- [96] **Okazaki Y., Furuno M., Kasukawa T., Adachi J., Bono H., Kondo S., Nikaido I., Osato N., Saito R., Suzuki H., Yamanaka I., Kiyosawa H., Yagi K., Tomaru Y., Hasegawa Y., Nogami A., Schönbach C., Gojobori T., Baldarelli R., Hill D. P., Bult C., Hume D. A., Quackenbush J., Schriml L. M., Kanapin A., Matsuda H., Batalov S., Beisel K. W., Blake J. A., Bradt D., Brusic V., Chothia C., Corbani L. E., Cousins S., Dalla E., Dragani T. A., Fletcher C. F., Forrest A., Frazer K. S., Gaasterland T., Gariboldi M., Gissi C., Godzik A., Gough J., Grimmond S., Gustincich S., Hirokawa N., Jackson I. J., Jarvis E. D., Kanai A., Kawaji H., Kawasaki Y., Kedziński R. M., King B. L., Konagaya A., Kurochkin I. V., Lee Y., Lenhard B., Lyons P. A., Maglott D. R., Maltais L., Marchionni L., McKenzie L., Miki H., Nagashima T., Numata K., Okido T., Pavan W. J., Pertea G., Pesole G., Petrovsky N., Pillai R., Pontius J. U., Qi D., Ramachandran S., Ravasi T., Reed J. C., Reed D. J., Reid J., Ring B. Z., Ringwald M., Sandelin A., Schneider C., Semple C. A., Setou M., Shimada K., Sultana R., Takenaka Y., Taylor M. S., Teasdale R. D., Tomita M., Verardo R., Wagner L., Wahlestedt C., Wang Y., Watanabe Y., Wells C., Wilming L. G., Wynshaw-Boris A., Yanagisawa M., Yang I., Yang L., Yuan Z., Zavolan M., Zhu Y., Zimmer A., Carninci P., Hayatsu N., Hirozane-Kishikawa T., Konno H., Nakamura M., Sakazume N., Sato K., Shiraki T., Waki K., Kawai J., Aizawa K., Arakawa T., Fukuda S., Hara A., Hashizume W., Imotani K., Ishii Y., Itoh M., Kagawa I., Miyazaki A., Sakai K., Sasaki D., Shibata K., Shinagawa A., Yasunishi A., Yoshino M., Waterston R., Lander E. S.,**

- Rogers J., Birney E., Hayashizaki Y.** Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60770 full-length cDNAs. FANTOM Consortium and the RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team. *Nature*, 420:563–573, 2002.
- [97] **Olson T. M., Michels V. V., Ballew J. D., Reyna S. P., Karst M. L., Herron K. J., Horton S. C., Rodeheffer R. J., Anderson J. L.** Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA*, 293(4):447–454, 2005.
- [98] **Ono K., Iijima T.** Pathophysiological significance of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: properties and functional roles of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiac pacemaking. *J Pharmacol Sci*, 99:197–204, 2005.
- [99] **Ono K., Ito H.** Role of rapidly activating delayed rectifier  $\text{K}^+$  current in sinoatrial node pacemaker activity. *Am J Physiol*, 269(2):H453–H462, 1995.
- [100] **Pandit S. V.** *Ionic mechanisms of atrial action potentials.* In: Zipes D. P., Jalife J., *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*, Elsevier, 6th edition. 309-318, 2013.
- [101] **Park D. S., Fishman G. I.** The cardiac conduction system. *Circulation*, 123(8):904–915, 2011.
- [102] **Razani B., Woodman S. E., Lisanti M. P.** Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, 54(3):431–467, 2002.
- [103] **Remme C. A.** Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol*, 2013.

- [104] **Ricci G., Scionti I., Alì G., Volpi L., Zampa V., Fanin M., Angelini C., Politano L., Tupler R., Siciliano G.** Rippling muscle disease and facio-scapulohumeral dystrophy-like phenotype in a patient carrying a heterozygous CAV3 T78M mutation and a D4Z4 partial deletion: Further evidence for “double trouble” overlapping syndromes. *Neuromuscul Disord*, 22(6):534–540, 2012.
- [105] **Sanguinetti M. C., Curran M. E., Spector P. S., Keating M. T.** Spectrum of HERG K<sup>+</sup>-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(5):2208–2212, 1996.
- [106] **Sarai N., Matsuoka S., Kuratomi S., Ono K., Noma A.** Role of individual ionic current systems in the SA node hypothesized by a model study. *Jpn J Physiol*, 53(2):125–134, 2003.
- [107] **Schulze-Bahr E., Neu A., Friederich P., Kaupp U. B., Breithardt G., Pongs O., Isbrandt D.** Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*, 111(10):1537–1545, 2003.
- [108] **Schweizer P. A., Duhme N., Thomas D., Becker R., Zehelein J., Draguhn A., Bruehl C., Katus H. A., Koenen M.** cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 3(5):542–552, 2010.
- [109] **Severi S., Fantini M., Charawi L. A., DiFrancesco D.** An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation. *J Physiol*, 590(18):4483–4499, 2012.

- [110] **Shannon T. R., Wang F., Puglisi J., Weber C., Bers D. M.** A mathematical treatment of integrated  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics within the ventricular myocyte. *Biophys J*, 87(5):3351–3371, 2004.
- [111] **Silverthorn D. U.** *Fisiologia Un approccio integrato*. Casa Editrice Ambrosiana, 3 edition, 2007.
- [112] **Smits J. P., Koopmann T. T., Wilders R., Veldkamp M. W., Opthof T., Bhuiyan Z. A., Mannens M. M., Balsler J. R., Tan H. L., Bezzina C. R., Wilde A. A.** A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol*, 38(6):969–981, 2005.
- [113] **Sánchez-Quintana D., Cabrera J. A., Farré J., Climent V., Anderson R. H., Ho S. Y.** Sinus node revisited in the era of electroanatomical mapping and catheter ablation. *Heart*, 91(2):189–194, 2005.
- [114] **Splawski I., Timothy K. W., Decher N., Kumar P., Sachse F. B., Beggs A. H., Sanguinetti M. C., Keating M. T.** Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(23):8089–8096, 2005.
- [115] **Splawski I., Timothy K. W., Sharpe L. M., Decher N., Kumar P., Bloise R., Napolitano C., Schwartz P. J., Joseph R. M., Condouris K., Tager-Flusberg H., Priori S. G., Sanguinetti M. C., Keating M. T.**  $\text{Ca}_v1.2$  calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 119(1):19–31, 2004.
- [116] **Stefani M., Taddei N.** *Chimica, biochimica e biologia applicata*. Zanichelli, 2 edition, 2008.

- [117] **Stump M. R., Gong Q., Zhou Z.** Isoform-specific dominant-negative effects associated with hERG1 G628S mutation in long QT syndrome. *PLoS One*, 7(8):e42552.1–e42552.9, 2012.
- [118] **Tellez J. O., Dobrzynski H., Greener I. D., Graham G. M., Laing E., Honjo H., Hubbard S. J., Boyett M. R., Billeter R.** Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. *Circ Res*, 99:1384–1393, 2006.
- [119] **Thomas D., Wimmer A. B., Karle C. A., Licka M., Alter M., Khalil M., Ulmer H. E., Kathöfer S., Kiehn J., Katus H. A., Schoels W., Koenen M., Zehelein J.** Dominant-negative  $I_{Ks}$  suppression by KCNQ1-deltaF339 potassium channels linked to Romano-Ward syndrome. *Cardiovasc Res*, 67(3):487–497, 2005.
- [120] **Ueda K., Nakamura K., Hayashi T., Inagaki N., Takahashi M., Arimura T., Morita H., Higashiuesato Y., Hirano Y., Yasunami M., Takishita S., Yamashina A., Ohe T., Sunamori M., Hiraoka M., Kimura A.** Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*, 279(26):27194–27198, 2004.
- [121] **Vaidyanathan R., Vega A. L., Song C., Zhou Q., Tan B., Berger S., Makielski J. C., Eckhardt L. L.** The interaction of caveolin 3 protein with the potassium inward rectifier channel Kir2.1: physiology and pathology related to long qt syndrome 9 (LQT9). *J Biol Chem*, 288(24):17472–17480, 2013.
- [122] **Vatta M., Ackerman M. J., Ye B., Makielski J. C., Ughanze E. E., Taylor E. W., Tester D. J., Balijepalli R. C., Foell J. D., Li Z., Kamp T. J.,**

- Towbin J. A.** Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*, 114(20):2104–2112, 2006.
- [123] **Veldkamp M. W., Viswanathan P. C., Bezzina C., Baartscheer A., Wilde A. A., Balser J. R.** Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na<sup>+</sup> channel. *Circ Res*, 86(9):E91–E97, 2000.
- [124] **Veldkamp M. W., Wilders R., Baartscheer A., Zegers J. G., Bezzina C. R., Wilde A. A.** Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families. *Circ Res*, 92(9):976–983, 2003.
- [125] **Verkerk A. O., van Borren M. M. G. J., Peters R. J. G., Broekhuis E., Lam K. Y., Coronel R., de Bakker J. M. T., Tan H. L., Wilders R.** Single cells isolated from human sinoatrial node: action potentials and numerical reconstruction of pacemaker current. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, pages 904–907, 2007.
- [126] **Verkerk A. O., van Borren M. M. G. J., Wilders R.** Calcium transient and sodium-calcium exchange current in human versus rabbit sinoatrial node pacemaker cells. *Scientific World Journal*, 2013, 2013.
- [127] **Verkerk A. O. van Ginneken A. C. G., Wilders R.** Pacemaker activity of the human sinoatrial node: Role of the hyperpolarization-activated current, I<sub>f</sub>. *Int J Cardiol*, 132(3):318–336, 2009.
- [128] **Verkerk A. O., Wilders R.** Relative importance of funny current in human versus rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol*, 48(4):799–801, 2010.

- [129] **Verkerk A. O., Wilders R.** Hyperpolarization-activated current,  $I_f$ , in mathematical models of rabbit sinoatrial node pacemaker cells. *Biomed Res Int*, 2013(872454):1–18, 2013.
- [130] **Verkerk A. O., Wilders R., van Borren M. M. G. J., Peters R. J. G., Broekhuis E., Lam K., Coronel R., de Bakker J. M. T., Tan H. L.** Pacemaker current ( $I_f$ ) in the human sinoatrial node. *European Heart Journal*, 28:2472–2478, 2007.
- [131] **Verkerk A. O., Wilders R., van Borren M. M. G. J., Tan H. L.** Is sodium current present in human sinoatrial node cells? *Int J Biol Sci*, 5(2):201–204, 2009.
- [132] **Wallingford J., Liu K., Zheng, Y.** *Xenopus*. *Current Biology*, 20:R263–R264, 2010.
- [133] **Wang D. W., Yazawa K., George A. L. Jr, Bennett P. B.** Characterization of human cardiac  $\text{Na}^+$  channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(23):13200–13205, 1996.
- [134] **Wang Q., Shen J., Li Z., Timothy K., Vincent G. M., Priori S. G., Schwartz P. J., Keating M. T.** Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet*, 4(9):1603–1607, 1995.
- [135] **Wang Q., Shen J., Splawski I., Atkinson D., Li Z., Robinson J. L., Moss A. J., Towbin J. A., Keating M. T.** SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 80(5):805–811, 1995.
- [136] **Wehrens X. H., Abriel H., Cabo C., Benhorin J., Kass R. S.** Arrhythmogenic mechanism of an LQT-3 mutation of the human heart  $\text{Na}^+$  chan-

- nel alpha-subunit: A computational analysis. *Circulation*, 102(5):584–590, 2000.
- [137] **Wei J., Wang D. W., Alings M., Fish F., Wathen M., Roden D. M., George A. L. Jr.** Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation*, 99(24):3165–3171, 1999.
- [138] **Wilhelms M., Hettmann H., Maleckar M. M., Koivumäki J. T., Dössel O., Seemann G.** Benchmarking electrophysiological models of human atrial myocytes. *Front Physiol*, 3(487):1–16, 2013.
- [139] **Williams T. M., Lisanti M. P.** The caveolin proteins. *Genome Biol*, 5(3):214.1–214.8, 2004.
- [140] **Xu X., Marni F., Wu S., Su Z., Musayev F., Shrestha S., Xie C., Gao W., Liu Q., Zhou L.** Local and global interpretations of a disease-causing mutation near the ligand entry path in hyperpolarization-activated cAMP-gated channel. *Structure*, 20(12):2116–2123, 2012.
- [141] **Zhang H., Holden A. V., Kodama I., Honjo H., Lei M., Varghese T., Boyett M. R.** Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279:H397–H421, 2000.
- [142] **Zhou Z., Gong Q., Epstein M. L., January C. T.** HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem*, 273(33):21061–21066, 1998.
- [143] **Zorn-Pauly K., Schaffer P., Pelzmann B., Lang P., Mächler H., Rigler B., Koidl B.** I<sub>f</sub> in left human atrium: a potential contributor to atrial ectopy. *Cardiovasc Res*, 64(2):250–259, 2004.



## Elenco delle figure

1.1	Raffigurazione del cuore in sezione frontale. . . . .	2
1.2	Figura adattata da Silverthorn et al. [111]: raffigurazione di cardiomiocita. . . . .	5
1.3	Figura tratta da Monfredi et al. [82]: tipici potenziali d'azione registrati da miociti atriali non specializzati (grigio) e da cellule nodali senoatriali (nero). . . . .	10
1.4	Figura adattata da Park e Fishman [101]: morfologia, fasi e principali correnti sottostanti del potenziale d'azione di miocita atriale non specializzato. . . . .	12
1.5	Figura tratta da Luo et al. [72]: ciclo del calcio intracellulare. . . . .	17
1.6	Figura adattata da Park e Fishman [101]: morfologia, fasi e principali correnti sottostanti del potenziale d'azione di miocita atriale specializzato. . . . .	19
2.1	Figura tratta da Dobrzynski et al. [33]: vista ventrale dell'atrio destro umano che mostra la sede del nodo senoatriale (SCV, <i>Superior Caval Vein</i> ; RAA, <i>Right Atrial Appendage</i> ; RV, <i>Right Ventricle</i> ). . . . .	26

- 2.2 Figura tratta da Chandler et al. [22]: colorazione tricromatica di Masson della sezione di tessuto circostante il nodo senoatriale umano. Sono evidenziati: in blu il tessuto connettivo; in viola/rosa i miociti contrattili. . . . . 28
- 2.3 Figura tratta da Chandler et al. [22]: analisi di clustering gerarchico a due vie dei trascritti di mRNA. I colori rosso e blu indicano rispettivamente sovraespressione e sottoespressione rispetto alla media (bianco). Gli alberi sopra e a lato rappresentano misure di similarità tra i tessuti e di correlazione tra i geni. . . . . 31
- 2.4 Figura tratta da Chandler et al. [22]: grafico di scaling multidimensionale dei trascritti di mRNA. . . . . 32
- 2.5 Figura tratta da Chandler et al. [22]: potenziali d'azione atriale del modello Courtemanche et al. e dell'area paranodale e nodo senoatriale calcolati da Chandler e collaboratori. Sono raffigurati, per ciascuno, la derivata dell'AP e il transiente di calcio, insieme ad un ingrandimento degli AP atriale e paranodale sovrapposti. . . 34
- 2.6 Figura tratta da Danielsson et al. [28]: livelli di mRNA dei trascritti dei geni codificanti per i canali responsabili per  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  in cellule umane. . . . . 36
- 2.7 Figura tratta da Drouin [35]: potenziale d'azione di SAN umano in controllo (A), in seguito a somministrazione di isoproterenolo (B) e acetilcolina (C). . . . . 38
- 2.8 Figura tratta da Verkerk et al. [130]: potenziale d'azione di cellula SAN umana. . . . . 40

2.9	Figura tratta da Verkerk et al. [130]: A, misurazione della corrente $I_f$ tramite sottrazione dei tracciati registrati in assenza e in presenza di $\text{Cs}^+$ ; B, correnti $I_{\text{step}}$ e $I_{\text{tail}}$ di $I_f$ ; C, curva steady-state e costante di tempo di (de)attivazione. . . . .	41
2.10	Figura tratta da Verkerk et al. [130]: effetto dell'applicazione di 2 mM $\text{Cs}^+$ sul potenziale d'azione di cellula SAN umana. . . . .	42
2.11	Figura tratta da Verkerk et al. [125]: curva di (de)attivazione (A) e costante di tempo (B) di SAN umano confrontate con quelle di altri modelli e dati sperimentali. . . . .	44
2.12	Figura tratta da Verkerk et al. [125]: ricostruzione numerica di $I_f$ sottostante il potenziale d'azione di SAN umano sperimentalmente registrato. . . . .	44
2.13	Figura tratta da Verkerk et al. [131]: A, AP di cellula SAN umana; B, protocollo di voltage-clamp utilizzato; C, registrazioni di correnti di sodio durante il gradino depolarizzante nel riquadro tratteggiato nel pannello B. . . . .	45
2.14	Figura adattata da Verkerk et al. [128]: potenziali d'azione registrati sperimentalmente in tre singole cellule di nodo senoatriale umano. . . . .	47
2.15	Figura adattata da Verkerk et al. [126]: tracciati (A) e parametri (B) del potenziale d'azione, e tracciati (C) e parametri (D) dei transienti di calcio in cellule di SAN umano e di coniglio a confronto. . . . .	49
2.16	Figura adattata da Verkerk et al. [126]: A, potenziale d'azione sperimentalmente registrato in SAN umano; B, derivata temporale di $V_m$ ; C e D, ricostruzioni numeriche di $I_f$ (C) e di $I_{\text{NaCa}}$ (D) confrontate con $I_{\text{net}}$ . . . . .	51

2.17	Figura adattata da Danielsson et al. [28]: potenziali d'azione spontanei di cellule embrionali umane. . . . .	52
2.18	Figura adattata da Danielsson et al. [28]: dipendenza dal voltaggio dell'attivazione di $I_{Kr}$ e $I_{Ks}$ in cellule embrionali di uomo, topo e coniglio. . . . .	52
2.19	Figura adattata da Danielsson et al. [28]: effetto di $1 \mu\text{M}$ E-4031 su AP spontanei di cellule embrionali umane. . . . .	53
3.1	Esempi di mutazioni frameshift (A), missenso (B), non-senso (C) e silente (D). . . . .	57
3.2	Accorciamento dei telomeri durante più cicli replicativi. . . . .	60
3.3	Trasfezione transiente e trasfezione stabile. . . . .	66
3.4	Esempi di plasmidi utilizzati nella mutagenesi sito-specifica. . . . .	68
3.5	Topologia schematica delle proteine HCN4 e MiRP1. I punti rossi indicano la posizione degli otto siti delle mutazioni di HCN4 e MiRP1 associate a bradicardia sinusale. I punti rossi divisi indicano i troncamenti risultanti dalle mutazioni non-senso 573X e 695X. . . . .	71
3.6	Topologia schematica del canale $\text{Na}_v 1.5$ codificato dal gene SCN5A. I punti grigi, neri e bianchi indicano la posizione dei siti delle mutazioni di SCN5A associate a bradicardia sinusale e sindrome del nodo malato. . . . .	81
3.7	Topologia schematica del canale $\text{K}_v 11.1$ codificato dal gene hERG e della subunità MiRP1. Indicate vi sono le posizioni dei siti delle mutazioni di hERG associate a bradicardia fetale e di MiRP1 associata a bradicardia sinusale. . . . .	93

3.8	Topologia schematica del canale $K_v7.1$ codificato dal gene <i>KCNQ1</i> . I punti grigi indicano la posizione dei siti delle mutazioni di <i>KCNQ1</i> associate a bradicardia sinusale e bradicardia fetale. . . . .	94
3.9	Topologia schematica dei canali $Ca_v1.1-1.4$ codificati dai geni <i>CACNA1</i> . I punti rossi indicano la posizione dei siti delle mutazioni di <i>CACNA1</i> associati a bradicardia sinusale e bradicardia fetale. . . . .	100
4.1	Potenziale d'azione (A) e transiente di calcio (B) del modello Koivumäki a 1 Hz. . . . .	108
4.2	Potenziale d'azione (A) e transiente di calcio (B) del modello Grandi a 1 Hz. . . . .	111
4.3	Figura tratta da Wilhelms et al. [138]: confronto tra i modelli Koivumäki e Grandi (insieme agli altri modelli atriali umani in letteratura [26, 76, 94]). Schematizzazione della cellula (A) e del $Ca^{2+}$ -handling (B); potenziale d'azione (C) e transiente di calcio (D). . . . .	112
4.4	Figura tratta da Severi et al. [109]: schematizzazione della cellula di nodo senoatriale di coniglio. . . . .	116
4.5	Figura tratta da Severi et al. [109]: potenziale d'azione del modello Severi e correnti e concentrazioni ioniche sottostanti. . . . .	119
4.6	Curva di (de)attivazione steady-state di $I_f$ , $y_\infty$ (A) e relativa costante di tempo (B): confronto tra i dati [130] e le formulazioni proposte da Verkerk et al. [125, 126] e del modello Severi et al. [109]. . . . .	123
4.7	Curva di attivazione steady-state di $I_{Kr}$ , $p_{a\infty}$ : confronto tra il fitting dei dati di Danielsson et al. [28] e la formulazione del modello Severi et al. [109]. . . . .	124

4.8	Curva di attivazione steady-state di $I_{Ks}$ , $n_{\infty}$ : confronto tra il fitting dei dati di Danielsson et al. [28] e la formulazione del modello Severi et al. [109]. . . . .	125
4.9	A, curve di attivazione ( $r_{\infty}$ ) e inattivazione ( $s_{\infty}$ ) steady-state di $I_{Kur}$ ; B, relative costanti di tempo. . . . .	126
4.10	Curve steady-state di attivazione $m_{\infty}$ (A) e di inattivazione $s_{\infty}$ (B) di $I_{Na}$ . . . . .	129
4.11	Potenziale d'azione generato dal presente modello a confronto con i tracciati sperimentali [125, 127, 128, 130]. . . . .	129
4.12	Potenziale d'azione generato dal presente modello e correnti, flussi e concentrazioni ioniche sottostanti. . . . .	130
4.13	Transiente di calcio intracellulare generato dal presente modello a confronto con il tracciato sperimentale [126]. . . . .	132
4.14	Simulazioni delle mutazioni geniche dei canali della corrente $I_f$ (A e B) e $I_{Na}$ (C e D). "No $I_{Na}$ " si riferisce alle mutazioni G1408R, R1623X, T187I, K1578fs/52 e W1421X caratterizzate da completa perdita di funzione. . . . .	134
4.15	Simulazioni delle mutazioni geniche dei canali della corrente $I_{Kr}$ (A), $I_{Ks}$ (B) e $I_{CaL}$ (C). . . . .	136
4.16	Simulazioni, secondo varianti diverse, delle mutazioni M54T (A) e $\Delta$ KPQ (B). . . . .	142
5.1	Figura tratta da Masson-Pévet et al. [79]: raffigurazione delle caveole in microscopia elettronica. . . . .	144
5.2	Figura adattata da Razani et al. 2002 [102]: organizzazione delle lipid rafts e delle caveolae nella membrana fosfolipidica. . . . .	145
5.3	Figura adattata da Cronk et al. [27]: topologia della proteina caveolina-3 (indicate vi sono le sedi delle mutazioni riscontrate). . . . .	146

5.4	Figura tratta da Cronk et al. 2007 [27]: cromatogrammi del sequenziamento del DNA per la mutazione T78M del gene CAV3. . .	149
5.5	Dati forniti da Andrea Barbuti: curve steady-state di (de)attivazione di $I_f$ nei casi di caveolina-3 wild-type (WT-Cav3) e mutata (T78M-Cav3). . . . .	150
5.6	Dati forniti da Andrea Barbuti: curve steady-state di attivazione (A) e inattivazione (B) di $I_{Kur}$ nei casi di caveolina-3 wild-type (WT-Cav3) e mutata (T78M-Cav3). . . . .	151
5.7	Figura tratta da Cronk et al. 2007 [27]: A, corrente late $I_{Na}$ misurata nei casi WT e T78M (insieme anche ad altre mutazioni) durante il voltage-clamp raffigurato; B, sommario dei valori di intensità della corrente late espressi in percentuale del picco. . . .	152
5.8	Figura tratta da Vaidyanathan et al. 2013 [121]: relazione I-V della corrente $I_{K1}$ nei casi WT w T78M (insieme anche ad altre mutazioni). . . . .	153
5.9	Dati forniti da Andrea Barbuti: relazione I-V della corrente $I_{K1}$ nei casi WT-Cav3 e T78M-Cav3 in cellule MEF (A) e in cardiomiociti neonatali di ratto (B). . . . .	154
5.10	Rapporto, espresso in percentuale, tra i dati relativi al caso T78M e WT di figura 5.8 e relativo fitting. . . . .	157
5.11	Modifica alla versione control del modello Koivumäki [61]: A, riproduzione del protocollo di voltage-clamp come in Cronk et al. [27]; B, variazione della pendenza di $h_\infty$ ; C, versione control modificata (con stimolazione a 1 Hz). . . . .	160
5.12	Simulazione (a 1 Hz) della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello Koivumäki. . . . .	161

- 5.13 Modifica alla versione control del modello Grandi [43]: A, riproduzione del protocollo di voltage-clamp come in Cronk et al. [27]; B, versione control dopo l'inserimento della corrente  $I_f$ ; C, versione control modificata (con stimolazione a 1 Hz). . . . . 162
- 5.14 Simulazione (a 1 Hz) della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello Grandi. . . . . 163
- 5.15 Modifica alla versione control del modello SAN umano descritto al capitolo 4: A, riproduzione del protocollo di voltage-clamp come in Cronk et al. [27]; B, variazione della pendenza di  $h_\infty$ ; C, versione control modificata. . . . . 164
- 5.16 Simulazione della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello di nodo senoatriale umano. . . . . 165
- 5.17 Simulazione (a 1 Hz) della mutazione T78M della caveolina-3 nei modelli atriali Koivumäki e Grandi, separatamente per corrente ionica: A  $I_f$ , B  $I_{Kur}$  e C  $I_{Na}$ . Nei pannelli superiori è raffigurato il potenziale d'azione, mentre, in quelli inferiori, la corrente ionica sottostante. . . . . 167
- 5.18 Simulazione del solo effetto su  $I_f$  della mutazione T78M della caveolina-3 nel modello di nodo senoatriale umano. . . . . 168
- 5.19 Simulazione (a 1 Hz), nei modelli atriali Koivumäki (A) e Grandi (B), dell'effetto modulatore sulla corrente  $I_{K1}$  in aggiunta agli effetti della mutazione T78M sulle correnti  $I_f$ ,  $I_{Kur}$  e  $I_{Na}$ . . . . . 169
- 5.20 Analisi dei parametri del potenziale d'azione al variare della frequenza di stimolo nei modelli Koivumäki (pannelli a sinistra) e Grandi (pannelli a destra), in condizioni di controllo e mutata. . . 170

- 
- 5.21 Figura adattata da Narayan et al. [86]: A, APD-alternans registrate a 450 ms di cycle length (S, short; L, long); B, curva di APD-restitution con pendenza  $> 1$ . . . . . 171
- 5.22 Curve di APD<sub>90</sub>-restitution ottenute dai modelli Koivumäki (A) e Grandi (B), in condizioni di controllo e mutata. . . . . 173



## Elenco delle tabelle

2.1	Dati tratti da Chandler et al. [22]: livelli individuali di mRNA dei principali canali ionici, normalizzati rispetto all'mRNA di riferimento 28S. . . . .	30
2.2	Dati tratti da Chandler et al. [22]: percentuali di mRNA e delle conduttanze dei principali canali ionici in SAN e area PN rispetto ai miociti atriali contrattili. . . . .	33
2.3	Dati tratti da Drouin [35]: parametri di AP di SAN umano in condizioni control e con isoproterenolo. . . . .	38
2.4	Dati tratti da Verkerk et al. [130]: morfologia ed elettrofisiologia di cellula SAN umana ( $C_m$ , capacità equivalente di membrana; $DDR_{100}$ , pendenza della fase DD nei primi 100 ms a partire dall'MDP). . . . .	40
2.5	Dati ricavati dalla figura 1D in Verkerk et al. [126]: parametri del transiente di calcio intracellulare. . . . .	49

- 3.1 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente funny. Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *AF*, Atrial Fibrillation; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di HCN2 wild-type; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura); >, variazione in aumento, <, variazione in diminuzione. . . . . 78
- 3.2 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente funny e del dominio di membrana MiRP1. Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT; \*\*, mutazione di MiRP1; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di HCN2 wild-type; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura); >, variazione in aumento, <, variazione in diminuzione. . . . . 79
- 3.3 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *IHR*, low Heart Rate; *SA*, Sinus Arrest; *LQT*, Long QT; *SB*, Sinus Bradycardia;  $\alpha \beta$ , subunità  $\alpha \beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura); <, variazione in diminuzione. . . . . 87

- 3.4 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *BrS*, Brugada Syndrome; *SSS*, Sick Sinus Syndrome; *AS*, Atrial Standstill; *SD*, Sudden Death; *LQT*, Long QT; *SP*, Sinus Pauses; *SND*, Sinus Node Dysfunction;  $\alpha\beta$ , subunità  $\alpha\beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). . . . . 88
- 3.5 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *IHR*, low Heart Rate; *SA*, Sinus Arrest; *LQT*, Long QT; *SB*, Sinus Bradycardia;  $\alpha\beta$ , subunità  $\alpha\beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). 89
- 3.6 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *BrS*, Brugada Syndrome; *SSS*, Sick Sinus Syndrome; *BA*, Bradiaritmia; *SD*, Sudden Death;  $\alpha\beta$ , subunità  $\alpha\beta$  SCN5A; -, valore non riportato. . . . . 90
- 3.7 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Na}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *SSS*, Sick Sinus Syndrome; *DCM*, Dilated Cardiomyopathy; *pAF*, paroxysmal Atrial Fibrillation; *AS*, Atrial Standstill;  $\alpha\beta$ , subunità  $\alpha\beta$  SCN5A; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). 91

- 3.8 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Kr}$ . Abbreviazioni e simbologia: *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; \*, mutazione di *MiRP1*; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); *om.\**, espressione di *HERG* (omozigote) + *MiRP1*; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). . . . . 96
- 3.9 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Ks}$ . Abbreviazioni e simbologia: *SB*, Sinus Bradycardia; *AF*, Atrial Fibrillation; *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di *KCNE1* in aggiunta a *KCNQ1*; \*\*, espressione di *KCNE2* in aggiunta a *KCNQ1*; \*\*\*, espressione di *KCNE3* in aggiunta a *KCNQ1*; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato. 97
- 3.10 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Ks}$ . Abbreviazioni e simbologia: *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *AF*, Atrial Fibrillation; *SB*, Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di *KCNE1* in aggiunta a *KCNQ1*; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). 98

- 3.11 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di sodio  $I_{Ks}$ . Abbreviazioni e simbologia: *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *LQT*, Long QT interval; *AF*, Atrial Fibrillation; *SB*, Sinus Bradycardia; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); \*, espressione di *KCNE1* in aggiunta a *KCNQ1*; *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). 99
- 3.12 Effetti delle mutazioni geniche che colpiscono il canale ionico della corrente di calcio  $I_{CaL}$ . Abbreviazioni e simbologia: *TS*, Timothy Syndrome; *fSB*, fetal Sinus Bradycardia; *QTp*, QT interval prolongation; *SB*, Sinus Bradycardia; *om.*, omozigosi (solo subunità mutate); *et.*, eterozigosi (subunità mutate + wild-type); *n. s.*, variazione non significativa; -, valore non riportato; ~, valore stimato (per esempio da una figura). . . . . 102
- 4.1 Parametri del potenziale d'azione e del transiente di calcio dei modelli Koivumäki e Grandi. . . . . 113
- 4.2 Dati tratti da Severi et al. [109]: parametri del potenziale d'azione di cellula di nodo senoatriale di coniglio. . . . . 120
- 4.3 Parametri del potenziale d'azione generato dal presente modello a confronto con i range sperimentali [126, 130]. . . . . 131
- 4.4 Simulazioni delle mutazioni geniche dei principali canali ionici: effetto sulla frequenza cardiaca (HR) (nel presente modello la frequenza basale è 72 bpm (CL= 833 ms)). *SB*, Sinus Bradycardia; *fSB*, fetal SB; *KO*, assenza di attività pacemaker. . . . . 138
- 5.1 Effetti simulati della mutazione T78M sulla morfologia dei potenziali d'azione dei modelli Koivumäki e Grandi. . . . . 166

- 5.2 Effetti simulati della mutazione T78M sulla morfologia del potenziale d'azione del modello di SAN umano. . . . . 166
- 5.3 Valori del cycle length ai quali si manifesta il fenomeno delle alternans nei modelli Koivumäki e Grandi, in condizioni di controllo e mutata. . . . . 172

# Glossario

Elenco dei termini e delle abbreviazioni più ricorrenti nel testo:

## AP

*Action Potential*: abbreviazione per il termine "potenziale d'azione".

## APA

*Action Potential Amplitude*: ampiezza, in mV, del potenziale d'azione.

## APD

*Action Potential Duration*: durata, in ms, del potenziale d'azione. È spesso calcolata ad una percentuale della ripolarizzazione (solitamente 30, 50 o 90%).

## Aritmia

Alterazione del normale ritmo cardiaco (sinusale).

## Bradycardia sinusale

SB, *Sinus Bradycardia*: aritmia caratterizzata da una frequenza cardiaca basale inferiore a 60 battiti al minuto. La bradicardia sinusale fetale (fSB, *fetal SB*) è, invece, definita come frequenza cardiaca inferiore a 100 battiti al minuto.

**Cellula atriale non specializzata**

Cardiomiocita atriale contrattile, detto "di lavoro".

**Cellula atriale specializzata**

Cellula pacemaker del nodo senoatriale.

**CL**

*Cycle length*: durata, in ms, del potenziale d'azione.

**DDR**

*Diastolic Depolarization Rate*: pendenza, in mV/s, della fase di depolarizzazione diastolica.

**Depolarizzazione diastolica**

DD, *Diastolic Depolarization*: fase di spontanea depolarizzazione del potenziale d'azione di cellula specializzata (fase 4).

**Fibrillazione atriale**

AF, *Atrial Fibrillation*: aritmia in cui gli atri si contraggono frequentemente e in modo irregolare a causa di impulsi elettrici caotici e disorganizzati.

**I<sub>CaL</sub>**

Corrente associata ai canali L-type del calcio (Ca<sub>v</sub>1.1-1.4).

**I<sub>CaT</sub>**

Corrente associata ai canali T-type del calcio (Ca<sub>v</sub>3.1-3.3).

**I<sub>f</sub>**

Corrente associata ai canali funny (HCN1-4).

**I<sub>K1</sub>**

Corrente *inward rectifier* di potassio (canali Kir2.1).

**I<sub>Kr</sub>**

Componente rapida della corrente rettificatrice di potassio (canali K<sub>v</sub>11.1).

**I<sub>Ks</sub>**

Componente lenta della corrente rettificatrice di potassio (canali K<sub>v</sub>7.1).

**I<sub>Kur</sub>**

Corrente ultra rapida di potassio (canali K<sub>v</sub>1.5).

**I<sub>Na</sub>**

Corrente rapida associata ai canali del sodio (Na<sub>v</sub>1.5).

**I<sub>NaCa</sub>**

Corrente associata allo scambiatore sodio-calcio (NCX).

**I<sub>NaK</sub>**

Corrente associata alla pompa sodio-potassio (NaK-ATPase).

**I<sub>to</sub>**

Corrente transiente associata ai canali del potassio (K<sub>v</sub>4.3).

**MDP**

*Maximum Diastolic Potential*: massimo valore negativo, in mV, raggiungibile dal potenziale d'azione di cellula specializzata.

**Mutazione genica**

Cambiamento della sequenza nucleotidica del DNA di un organismo che interessa un singolo gene; si può verificare per sostituzione, inserzione, duplicazione o delezione di una base azotata.

**OS**

*Overshoot*: massimo valore positivo, in mV, del potenziale d'azione.

**Plateau**

Appiattimento del potenziale d'azione dovuto all'ingresso di calcio che contrasta l'uscita di potassio (fase 2); è caratteristico del potenziale d'azione dei cardiomiociti di lavoro, molto più pronunciato in quelli ventricolari.

**Potenziale d'azione**

Evento elettrico di breve durata in cui il potenziale di membrana di una cellula si alza e si abbassa rapidamente, seguendo un determinato profilo, osservabile in corrispondenza dell'eccitazione elettrica della cellula.

**Potenziale di membrana**

Valore di tensione, espresso in mV, misurato ai capi della membrana cellulare, generato da flussi di ioni attraverso i rispettivi canali ionici secondo gradiente elettrico e di concentrazione.

**Potenziale di Nernst**

Relativamente allo ione considerato, valore del potenziale di membrana misurato in condizioni d'equilibrio, nell'ipotesi che questa sia permeabile al solo ione in esame.

**RMP**

*Resting Membrane Potential*: valore di riposo, in mV, del potenziale d'azione di cellula non specializzata.

**SAN**

*Sinoatrial Node*, nodo senoatriale: costituisce il pacemaker primario del cuore generando lo stimolo elettrico spontaneo necessario alla contrazione dell'organo cardiaco.

**Sindrome del nodo malato**

SSS, *Sick Sinus Syndrome*: aritmia contraddistinta da bradicardia sinusale inappropriata, arresto sinusale o incompetenza cronotropica.

**Sindrome del QT lungo**

LQTS, *Long QT Syndrome*: anomalia cardiaca caratterizzata da una ritardata ripolarizzazione delle cellule miocardiche, riconoscibile sull'ECG come prolungamento del tratto QT.

**Tachicardia**

Accelerazione del battito cardiaco. Si distingue in sinusale, eterotopa (sopraventricolare e ventricolare) e atriale.

**Upstroke**

Fase di rapida salita del potenziale d'azione, identificata con la fase di depolarizzazione (fase 0).

**V<sub>max</sub>**

*maximum Velocity*: massima velocità di salita, in V/s, del potenziale d'azione durante l'upstroke.