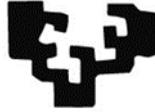


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

EFEECTO DE LA INHIBICIÓN DEL COMPLEJO mTOR EN LA REGULACIÓN DE LA CORRIENTE hERG

Víctor Fernández López

TESIS DOCTORAL

Departamento de fisiología

UPV-EHU

2022

Directores: Oscar Casis Sáenz y Mónica
Gallego Muñoz

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
1. Actividad eléctrica cardiaca	6
1.1 Registro de la actividad eléctrica del corazón: el electrocardiograma	7
1.2 Potencial de Acción Cardíaco	8
2.1 Canales de potasio dependientes de voltaje.	13
2.1.1 Activación de los canales de potasio	15
2.1.2 Inactivación de los canales de potasio.....	18
2.1.3 El estado de reposo en los canales de potasio.....	20
2.2. Canales de Sodio y Calcio.	20
3. El Canal de potasio Kv11.1 o hERG	22
3.1 Síntesis y degradación del canal hERG.....	23
3.2 Funcionamiento del canal hERG.....	24
3.3 El papel del canal hERG en el potencial de acción ventricular.....	26
3.4 Moduladores del canal hERG.	29
3.4.1 Activadores de hERG	29
3.4.2 Bloqueantes de hERG.....	31
3.5 Vías intracelulares que regulan a hERG	31
4. Mammalian Target of Rapamycin o mTOR	32
4.2 Distintos complejos mTOR	33
4.3 Vía de activación de mTORC1	34
4.3.1 Moduladores positivos: Nutrientes, factores de crecimiento y aminoácidos.	34
4.3.2 Moduladores negativos: falta de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia y daño genético.	35
4.4 Vía de activación de mTORC2.....	35
4.5 Funciones de mTORC1	36
4.5.1 mTORC1 regula la traducción de proteínas.....	37
4.5.2 mTORC1 inhibe la autofagia	38
4.5.3 mTORC1 regula el metabolismo celular	40
4.6 Funciones de mTORC2.....	41
4.6.1 Supervivencia celular	41
4.6.2 Organización del citoesqueleto	42
4.7 Efecto de mTOR sobre los canales iónicos	42
4.9.1 Actividad antifúngica de la rapamicina	45
4.9.2 Actividad inmunosupresora	46
4.9.3 Actividad antitumoral	46
4.9.4 Efecto de la Rapamicina en la esperanza de vida	47

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
MATERIAL Y MÉTODOS	52
1. Equipamiento.....	54
1.1 Equipamiento general.	54
1.2 Mantenimiento y transfección de los cultivos celulares.	54
1.3 Registros electrofisiológicos.....	55
1.4 Detección de proteínas	55
2. Disoluciones	56
2.1 Medio de cultivo para el mantenimiento de células Hek-293 y Hek-hERG	56
2.2 Medio de cultivo para el mantenimiento de células HL-1.	56
2.3 Disoluciones para el levantamiento de los cultivos celulares	57
2.4 Disoluciones para la congelación de células HEK-HERG	57
2.5 Disoluciones para la transfección celular	57
2.6 Disoluciones empleadas en los registros electrofisiológicos.	57
2.6.1 Solución interna para registrar IhERG	57
2.6.2 Solución externa para registrar IhERG	58
2.6.3 Solución interna para registrar IKur.	58
2.6.4 Solución externa para registrar IKur	58
2.7 Disoluciones para la detección de proteínas.	59
2.7.1 Tampón de lisis	59
2.7.2 Geles para electroforesis	59
2.7.3 Tampón Laemli.....	59
2.7.4 Tampón electroforesis	60
2.7.5 Tampón transferencia Tris-HCl 25 mM, pH 8.3	60
2.7.6 TBS (Tris-Buffer-Saline)	60
2.7.7 Solución de lavado TTBS (TBS-Tween)	60
2.7.8 Solución de bloqueo.....	60
2.7.9 Reactivos de revelado.....	61
3. Small interfering RNA (siRNA).....	61
4. Anticuerpos.....	61
4.1 Anticuerpos primarios.....	61
4.2 Anticuerpos secundarios	61
5. Cultivos celulares.....	61
5.1 Mantenimiento de los cultivos	62
5.2 Propagación del cultivo	62
5.3 Criopreservación de los cultivos.....	63
6. Tratamientos con Rapamicina, Torina y JRAB2011	64
7. Silenciamientos mediante transfección de siRNA.....	64
8 Lisado de células y extracción y detección de proteínas.....	66

8.1 Cuantificación de proteínas.....	67
8.2 Detección de proteínas mediante electroforesis y Western Blot	67
8.3. Desnaturalización de la muestra y parámetros de la electroforesis y transferencia	69
8.4 Tinción con Rojo Ponceau	70
8.5 Bloqueo e incubación con anticuerpos	71
8.6 Revelado	71
8.7 Análisis de imagen	72
9. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	72
10. Técnica de pinzamiento de membrana o Patch-Clamp	73
10.1 Protocolos de registro de la corriente hERG (I_{hERG}) en células HEK-hERG.....	79
10.1.1 Protocolo Corriente-Voltaje	79
10.1.2 Protocolo Corriente-Voltaje Totalmente Activado	82
10.1.3 Protocolo Amplitud de Corriente-Tiempo	84
10.2 Protocolo de registro de la corriente I_{Kur} en HL-1.....	86
11. Análisis estadístico	88
RESULTADOS.....	90
1. Efecto de la incubación durante 24h con Rapamicina sobre la corriente I_{hERG}	92
1.1 Efecto de la inhibición crónica de mTOR sobre la I_{hERG}	92
1.2 El tratamiento con Rapamicina durante 24h aumentó la amplitud de la corriente I_{hERG}	92
1.3 El tratamiento con Rapamicina durante 24h no alteró el voltaje medio de activación del canal hERG	94
1.4 El tratamiento con Rapamicina durante 24h no alteró la constante de tiempo de deactivación del canal hERG	96
1.6 El tratamiento con Rapamicina durante 24h no alteró el voltaje de inversión del canal hERG.....	96
1.7 La Rapamicina no tuvo efecto agudo en la corriente hERG.....	98
1.8 El aumento de la corriente hERG se debe a la inhibición de mTOR.....	101
2. Efectos de la inhibición de mTOR durante 24h sobre la cantidad de canales hERG	102
2.1. El tratamiento durante 24h con Rapamicina aumentó la cantidad de canales hERG	102
2.2 El tratamiento con Rapamicina durante 24h aumentó el tráfico del canal hERG a la membrana	104
3.Efectos de la inhibición de mTOR durante 24h en el recambio (Turnover) del canal hERG.....	105
3.1 El tratamiento con Rapamicina durante 24h aumentó la síntesis de proteína sin afectar a su degradación.....	105
4.Efectos de la inhibición de mTOR en la transcripción del canal hERG	107
4.1 La incubación con Rapamicina 24h no alteró la expresión de mRNA del canal hERG	107
5. Papel de mTOR-C1 y mTOR-C2 en el aumento de la expresión de hERG	108
5.1 El silenciamiento de Rictor no modifica la expresión de hERG	108

5.2 El silenciamiento de Rictor no altera la densidad de corriente hERG	109
5.3 siRICTOR combinado con Rapamicina en concentración baja no aumentaron la I_{hERG}	110
5.4 La incubación durante 24h con JRAB2011 3 μ M no tiene efecto sobre la densidad de corriente hERG.....	112
5.5. El silenciamiento de Raptor no aumentó la expresión del canal hERG	113
5.6. El silenciamiento de Raptor no alteró la densidad de corriente hERG	114
5.7. siRAPTOR combinado con Rapamicina en concentración baja aumentan I_{hERG} ...	114
DISCUSIÓN	120
1. La inhibición prolongada de mTOR aumenta la corriente hERG	122
2. La inhibición prolongada de mTOR aumenta la traducción y el tráfico a membrana del canal hERG	124
3. El responsable del aumento de hERG es el complejo mTORC1	126
4. La regulación por parte de mTOR no es específica del canal hERG	129
CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFÍA	134

Figura 1. Forma y amplitud del potencial de acción en las distintas zonas del corazón.	7
Figura 2. Representación de un latido cardíaco en un electrocardiograma.	8
Figura 3. Potencial de acción ventricular.....	10
Figura 4. Conformaciones de un canal iónico.	12
Figura 5. Canal de potasio dependiente de voltaje y filtro de selectividad.	13
Figura 6. Estructura de un canal de potasio dependiente de voltaje.	14
Figura 7. Mecanismo de entrada de un ion de potasio en el filtro de selectividad	15
Figura 8. Apertura de un canal de potasio dependiente de voltaje según el modelo de Bezanilla.	16
Figura 9. Apertura de un canal de potasio dependiente de voltaje según el modelo de MacKinnon.....	17
Figura 10. Modelo de apertura de canales Kv10 y Kv11.....	18
Figura 11. Mecanismos de inactivación de los canales de potasio.	19
Figura 12. Estructura básica de los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje.....	21
Figura 13. Estructura del canal hERG.....	22
Figura 14. Biosíntesis, maduración, tráfico a membrana e interlaización del canal hERG.....	24
Figura 15. Cambio de conformación de los monómeros del canal hERG.	25

Figura 16. Alargamiento del potencial de acción por la reducción del canal hERG y síndrome de QT largo	27
Figura 17. Comparación de potenciales de acción en condiciones control, con una reducción de la corriente IKr del 30% y una reducción del 70%.....	28
Figura 18. Tipos de activadores y sus efectos en diferentes parámetros de la corriente hERG.....	30
Figura 19. Regulación α adrenérgica del canal hERG.	32
Figura 20. Componentes de los complejos mTORC1 y mTORC2.	34
Figura 21. Vía de señalización de mTOR.....	36
Figura 22. mTORC1 regula la síntesis de proteínas a nivel de traducción.....	37
Figura 23. Formación del autofagolisosoma.....	38
Figura 24. Inhibición de la autofagia por mTORC1.	39
Figura 25. mTORC1 regula el metabolismo de lípidos, glucólisis y biogénesis mitocondrial.....	41
Figura 26. Funciones de mTORC2.....	42
Figura 27. Síntesis de la Rapamicina mediante enzimas PKS.....	44
Figura 28. Mecanismo de acción de la Rapamicina y la inhibición de mTOR en células T.....	45
Figura 29. Mecanismo de acción del siRNA dentro de la célula.....	65
Figura 30. Equipamiento para la técnica de Western Blot.....	69
Figura 31. Incubación de la membrana con Rojo ponceau.	70
Figura 32. Análisis del revelado con Image J.....	72
Figura 33. Elementos que forman el aparato de Patch Clamp:.....	74
Figura 34. Colocación de las células para Patch-Clamp.....	75
Figura 35. Estirador de pipetas.	76
Figura 36. Display de registro en Clampex.....	77
Figura 37. Formación del parche de membrana con la configuración “whole cell”. Se muestra la conformación en la que un pedazo de membrana se introduce en la pipeta para posteriormente romperse y permitir el paso de corriente.	78
Figura 38. Protocolo corriente voltaje.....	80
Figura 39. Curva corriente voltaje de la corriente hERG en condiciones control	81
Figura 40. Curva de activación de la corriente hERG en condiciones control. .	82
Figura 41. Protocolo corriente-voltaje totalmente activada en condiciones control.	83
Figura 42. Curva corriente voltaje totalmente activada en condiciones control.	84

Figura 43. Protocolo amplitud de corriente-tiempo en condiciones control.	85
Figura 44. Curva corriente-tiempo en condiciones control.	85
Figura 45. Protocolo corriente voltaje para I_{Kur} en conciones control.	87
Figura 46. Curva corriente voltaje de la corriente I_{Kur} en condiciones control. ...	87
Figura 47. Efecto de la Rapamicina en la corriente hERG	92
Figura 48. Efectos de la Rapamicina en la densidad de corriente hERG.	93
Figura 49. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente hERG a y +10 mV.	94
Figura 50. Efecto de la Rapamicina en la curva de activación de la corriente hERG.	95
Tabla 1. Efecto de la Rapamicina en el voltaje medio de activación de la corriente hERG.	95
Tabla 2. Efecto de la Rapamicina en la constnate de tiempo ed deactivación de la corriente hERG.	96
Tabla 3. Efecto de la Rapamicina en el voltaje de inversión del canal hERG. .	97
Figura 51. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente hERG totalmente activada.	97
Figura 52. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG. ...	98
Figura 53. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG tras 35 minutos de exposición a la Rapamicina.	99
Figura 54. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG tras 35 minutos de incubación con Rapamicina.	100
Figura 55. Figura 53. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG tras 65 minutos	100
Figura 56. Efecto de la Torina en la densidad de corriente hERG.	101
Figura 57. Efecto de la Torina en la densidad de corriente hERG a 10 mV. ...	102
Figura 58. Efecto de la Rapamicina en la expresón de canales hERG.	103
Figura 59. Efecto de la Torina en la expresón de canales hERG.	104
Figura 60. Efecto de la Rapamicina en el ratio de glicosilación de canales hERG.	105
Figura 61. Efecto de la Rapamicina sobre la síntesis y degradación de canales hERG.	106
Figura 62. Efecto de la Rapamicina en la transcripción de canales hERG. ...	107
Figura 63. Efecto del silenciamiento de Rictor en la expresiónde Rictor y canales hERG.	109
Figura 64. Efecto del silenciamiento de Rictor en la densidad de corriente hERG.	110

Figura 65. Efecto del silenciamiento de Rictor combinado con Rapamicina en la densidad de corriente hERG.	111
Figura 66. Efecto del silenciamiento de Rictor combinado con Rapamicina en la densidad de corriente hERG a +10 mV	112
Figura 67. Efecto del JRAB2011 en la densidad de corriente hERG.	112
Figura 68. Efecto del silenciamiento de Raptor en la expresión de Raptor y canales hERG	113
Figura 69. Efecto del silenciamiento de Raptor en la densidad de corriente hERG.	114
Figura 70. Efecto del silenciamiento de Raptor combinado con Rapamicina en la densidad de corriente hERG.	115
Figura 71. Efecto del silenciamiento de Raptor combinado con la Rapamicina en la densidad de corriente hERG a +10 mV.	116
Figura 72. Efecto de la Rapamicina en la corriente I_{Kur}	117
Figura 73. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente I_{Kur}	118
Figura 74. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente I_{Kur} a +20 mV.	118
Figura 75. mTORC1 regula la expresión del canal hERG.	128

RESUMEN

El gen KCNH2 o hERG (*human ether-a-go-go related gene*) codifica las subunidades α del canal KV11.1, responsable de la corriente rectificadora tardía rápida de potasio, I_{Kr} , en humanos que es fundamental para una correcta repolarización y controla la duración del intervalo QT del electrocardiograma. Una reducción de esta corriente puede causar síndrome de QT largo tipo 2, la cual aumenta la susceptibilidad a padecer arritmias graves como la torsión de puntas. Diversas hormonas como la insulina o la leptina, y factores tróficos como el IGF-1 o la noradrenalina que son necesarios para la correcta expresión de canales de potasio cardiacos también son activadores de la quinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Es por eso que proponemos a mTOR como un posible regulador del canal hERG y usaremos la inhibición de la vía como herramienta para probar su participación en la regulación del canal. Los resultados obtenidos muestran que tal y como pensábamos, la inhibición de mTOR, concretamente del complejo mTORC1, aumentan la corriente hERG mediante un aumento de la traducción y tráfico a membrana de canales hERG. Esto convierte a mTORC1 en una interesante diana a estudiar para tratar patologías como el LQTS2.

INTRODUCCIÓN

1. Actividad eléctrica cardiaca

El corazón es el órgano que se encarga de enviar sangre al resto de tejidos del organismo. Para bombear la sangre, las aurículas y los ventrículos del corazón se contraen en respuesta a impulsos eléctricos que se generan y propagan de forma organizada. La sangre se bombea de las aurículas a los ventrículos y de los ventrículos al resto de tejidos. Debido a que el bombeo ventricular tiene que recorrer más camino que el auricular, la pared ventricular es más gruesa y se diferencian tres zonas de dentro a fuera: el endocardio, la zona media y el epicardio (Nerbonne & Kass, 2005).

En el nodo sinoauricular, situado en la pared lateral superior de la aurícula derecha, se encuentran las células marcapasos. Estas células tienen actividad espontánea y por tanto están especializadas en generar el impulso eléctrico. Los impulsos viajan hacia el nodo auriculoventricular, donde se retienen un tiempo, antes de viajar a través de las fibras de Purkinje. Desde aquí el impulso eléctrico se propaga por los ventrículos desde el endocardio hacia el epicardio.

Los impulsos eléctricos se denominan potencial de acción (PA) y son el resultado de una combinación de corrientes iónicas que producen cambios en el potencial de la membrana celular. El potencial de acción cardíaco consiste en una rápida subida del potencial de membrana o despolarización seguida de una fase más o menos isoelectrica y finalmente por una repolarización. Estas corrientes iónicas son movimientos de iones que entran y salen de la célula a través de proteínas transmembrana llamadas canales iónicos. La distribución y cantidad de estos canales no es igual en todas las células cardíacas, es por eso que en cada zona del corazón la forma y amplitud del potencial de acción es diferente (Figura 1).

La propagación del impulso eléctrico y la contracción muscular del corazón están acopladas y posibilitan el ciclo cardíaco. El impulso eléctrico que se genera en el nodo sinoauricular viaja por las aurículas y produce su contracción. De ese modo, la sangre pasa a los ventrículos. En el nodo auriculoventricular, la propagación se retiene para que los ventrículos puedan llenarse de sangre. Finalmente, el impulso se propaga hacia las fibras de

Purkinje y de ahí a los ventrículos. De ese modo los ventrículos se contraen y bombean la sangre al resto de tejidos.

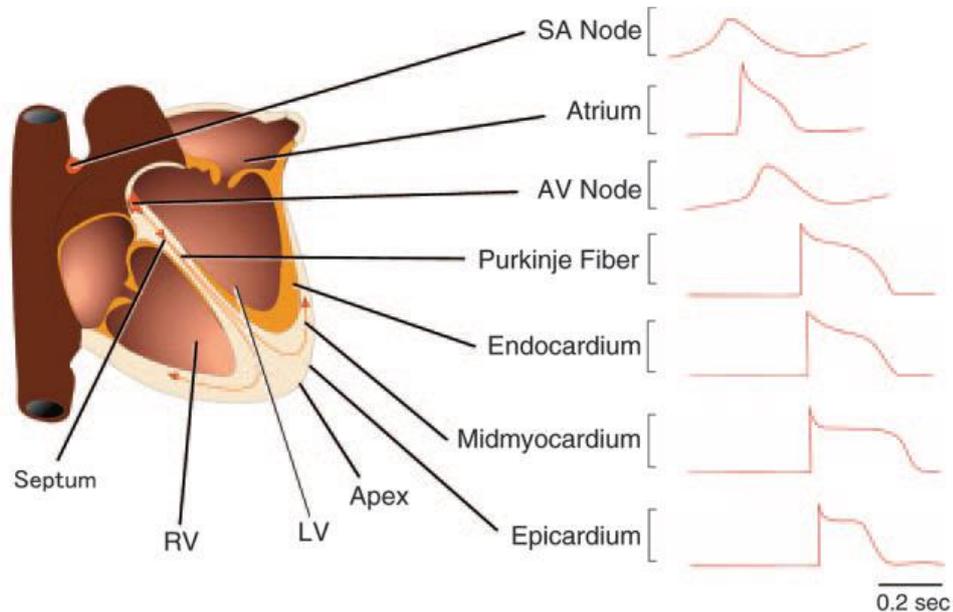


Figura 1. Forma y amplitud del potencial de acción en las distintas zonas del corazón. Esquema de las distintas partes del corazón humano (izquierda) con sus respectivos tipos de potenciales de acción(derecha) (Nerbonne, 2000)

1.1 Registro de la actividad eléctrica del corazón: el electrocardiograma

El electrocardiograma es el registro que recoge la actividad eléctrica total del corazón. Contiene la suma de todos los potenciales de acción de las diferentes zonas cardiacas. El electrocardiograma consta de varias ondas, segmentos y complejos que se corresponden con el recorrido de los PA en el corazón (Figura 2) (Harris, 2016; Chiamvimonvat *et al*, 2017):

- Onda P: Corresponde a la despolarización de las aurículas.
- Complejo QRS: Recoge las ondas Q, R y S, que se generan al despolarizarse los ventrículos.
- Onda T: Representa la repolarización de los ventrículos.

En definitiva, cada complejo PQRST corresponde a un latido cardíaco. Alteraciones en este registro pueden ayudar a encontrar posibles fallos en el latido cardiaco, como es el caso de las arritmias cardiacas.

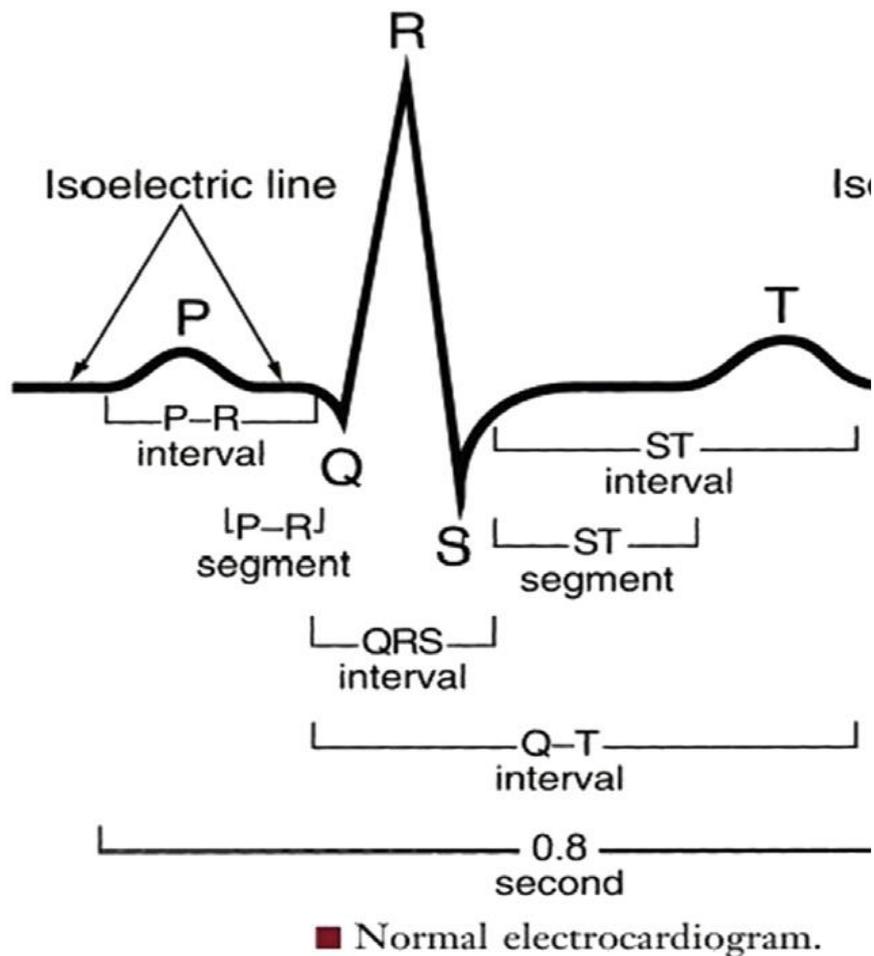


Figura 2. Representación de un latido cardíaco en un electrocardiograma. Se detallan las ondas, segmentos y complejos (modificado de Harris, 2016)

1.2 Potencial de Acción Cardíaco

El potencial de acción consta de 5 fases en las que participan distintos canales iónicos. Las fases del potencial de acción son las siguientes (Harris, 2016) (Figura 3):

1.2.1 Fase 0 o despolarización rápida.

Cuando el cambio del potencial de membrana sobrepasa el potencial umbral, dispara un potencial de acción. Ese cambio en el voltaje produce la apertura de los canales de sodio NaV1.5, la cual hace que el sodio entre en la célula movido por su gradiente electroquímico. Se produce una despolarización rápida que eleva el potencial de la membrana desde -90 mV a +30 mV

aproximadamente. La corriente iónica responsable de la fase 0 es la corriente rápida de entrada de sodio o I_{Na}

1.2.2. Fase 1 o repolarización rápida inicial.

En la fase 1 se inicia la repolarización de la membrana. Esta fase se debe a que se cierran los canales de sodio y se abren un tipo de canales de potasio. Se trata de los canales $Kv4.3$, responsables de la corriente transitoria de salida de potasio o I_{to} .

1.2.3 Fase 2 o meseta.

La fase de meseta es característica del potencial de acción cardiaco. Recibe ese nombre porque el potencial de membrana se mantiene más o menos en un punto isoelectrico durante un periodo de tiempo que en el ventrículo puede llegar a 200 o 300 ms.

Varios canales iónicos son responsables de esta fase de meseta. Por un lado, la apertura de los canales de calcio $Cav1.2$, permiten la entrada de calcio a la célula y generan la corriente de entrada de calcio tipo L o I_{Ca-L} . Por otro lado, la apertura de canales de potasio provoca la salida de potasio de la célula y contrarresta la entrada de cargas positivas del calcio. Los canales $Kv4.3$ responsables de la I_{to} participan al inicio de la meseta. Luego, los $Kv4.3$ se cierran y son los canales $Kv11.1$ o $hERG$ los que se encargan de mantener la meseta. Estos canales conducen la corriente rectificadora tardía rápida o I_{Kr} . Además, los canales $Kv7.1$ responsables de la corriente rectificadora tardía lenta o I_{Ks} participan en situaciones en las que la frecuencia cardiaca es alta o en situaciones activación adrenérgica.

1.2.4 Fase 3 o repolarización rápida final

En esta fase los canales de calcio se cierran y los canales $hERG$ cada vez están más activos, lo cual produce una rápida repolarización.

1.2.5 Fase 4 o reposo

Finalmente, los canales de potasio $Kir2.1/2.2$ mantienen el potencial de reposo de la célula y generan la corriente rectificadora de potasio anómala o I_{K1} . Además de los canales iónicos, las bombas de sodio/calcio y de sodio/potasio

también ayudan a mantener el estado de reposo manteniendo el sodio fuera de célula.

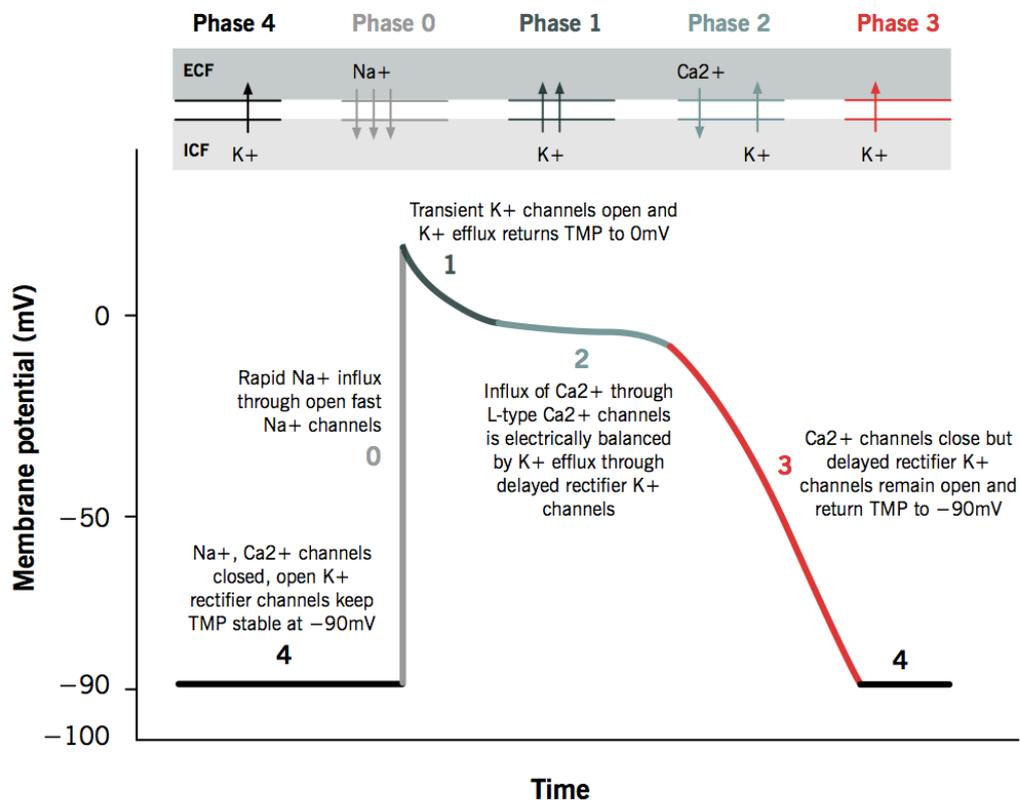


Figura 3. Potencial de acción ventricular. Se detallan las cinco fases, los canales que participan y los movimientos de iones que tienen lugar en cada una de ellas. (<http://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-contractility/>)

2. Canales iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que forman poros que permiten el paso de iones como el sodio, el potasio o el calcio a favor de su gradiente electroquímico. Estos canales tienen gran importancia en muchos procesos fisiológicos como la transducción sensorial, la transmisión sináptica o la contracción muscular. Los canales iónicos pueden clasificarse en función del estímulo que provoca su apertura. Existen tres grupos: los canales dependientes del voltaje, los canales activados mecánicamente y los canales dependientes de ligando. La presente Tesis Doctoral se centrará únicamente en los canales dependientes de voltaje. Estos canales se abren en respuesta a cambios en el

voltaje de la membrana plasmática y son los que participan en el potencial de acción cardíaco.

Los canales dependientes de voltaje están formados por una subunidad principal, llamada subunidad α , y por subunidades reguladoras o accesorias. La subunidad α es la principal porque contiene los elementos esenciales para que el canal se abra y conduzca corriente. Entre esos elementos funcionales destacan el filtro de selectividad, que determina la permeabilidad (preferente) a un determinado ion; el sensor de voltaje, encargado de detectar los cambios de potencial de membrana; las compuertas de apertura y cierre del canal; y sitios de unión a reguladores como proteínas quinasas o a lípidos. Al contrario que las subunidades α que atraviesan la membrana plasmática, las subunidades accesorias (subunidades β , KChIPs...) pueden ser citoplasmáticas o extracelulares. El número y tipo de subunidades accesorias depende del tipo de canal (Cui *et al*, 2001; Robert *et al*, 2005; Catterall *et al*, 2019).

El nombre de cada canal hace referencia al ion para el que son permeables, no siendo nunca absolutamente específicos. La permeabilidad depende del tamaño y las propiedades físico/químicas del ion. El poro por el que entran los iones se va estrechando a medida que el ion se acerca al filtro de selectividad, que interactúa con el ion para determinar si cruza o no el poro. Si en la interacción el ion es capaz de cruzar la parte del filtro también cruzará el poro al otro lado (Hille, 2001).

Los canales iónicos son dinámicos y sus subunidades α sufren cambios de conformación que les permiten abrir o cerrar el poro. El proceso de apertura y cierre del canal se conoce como gating. Se conocen tres conformaciones: el estado de reposo (R) donde el canal se encuentra cerrado, el estado activo (A) en el cual el canal se encuentra abierto y permite el paso de iones, y el estado inactivo (I) donde el canal se encuentra de nuevo cerrado (Figura 4) (Roux, 2017).

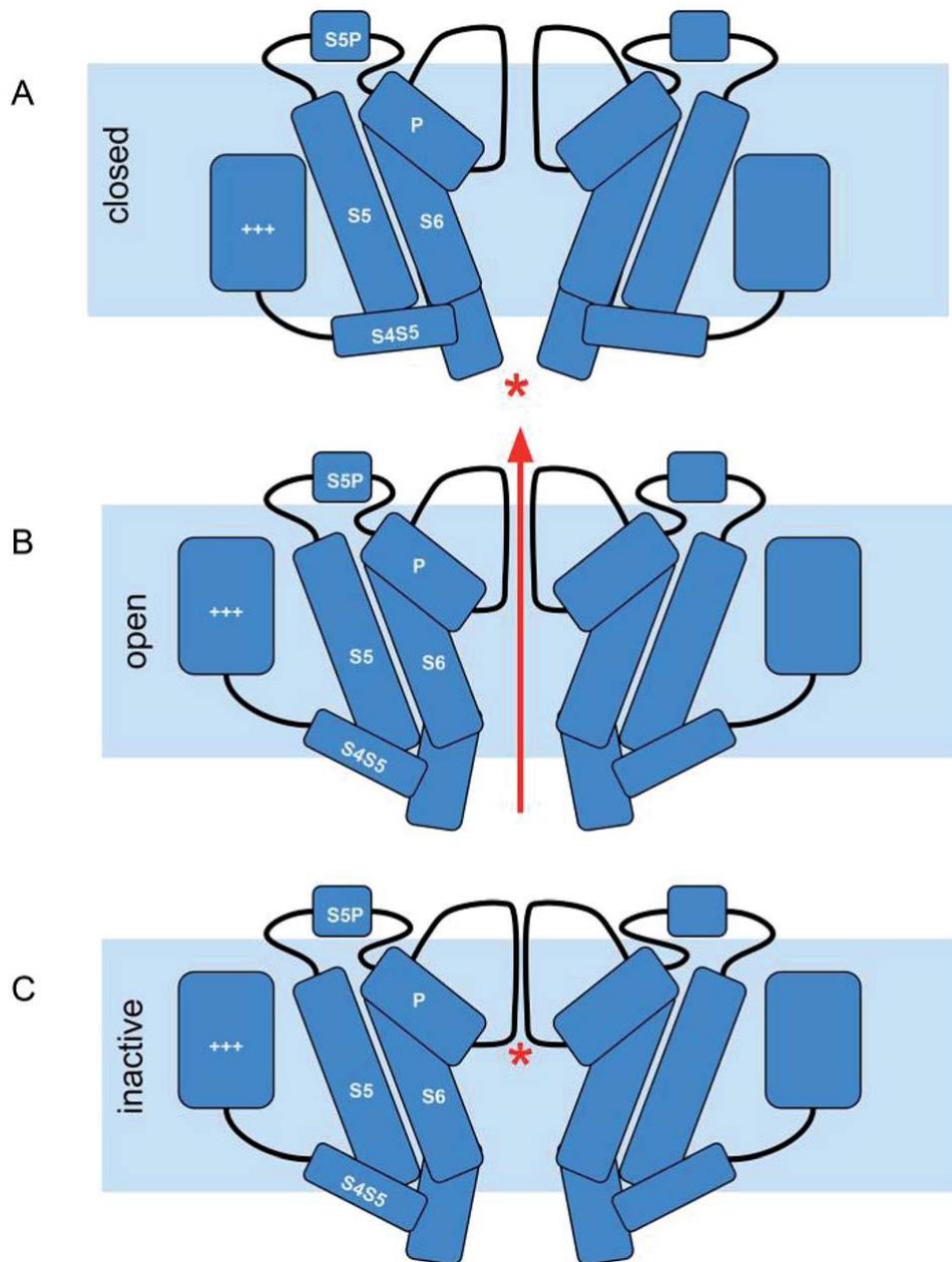


Figura 4. Conformaciones de un canal iónico. Estado de reposo (A), activo (B) e inactivo (C) (Rollinger *et al*, 2017).

El estado conformacional del canal depende de los cambios del potencial de la membrana. Estos cambios son detectados por el sensor de voltaje y traducidos como un cambio conformacional que mueve las compuertas de activación e inactivación. A potenciales hiperpolarizados, los canales se mantienen en estado de reposo y los iones no pueden cruzar por el poro. Cuando la membrana celular se despolariza, los canales detectan el cambio de voltaje y pasan al estado abierto, permitiendo el paso de iones. Por último, después de

abrirse los canales pasan a un estado inactivo que impide de nuevo el paso de iones. La mayoría de los canales iónicos necesitan retornar al estado de reposo antes de volver a abrirse. El canal de potasio hERG (Kv11.1), sobre el que se centra esta Tesis Doctoral, supone una excepción a ese comportamiento.

2.1 Canales de potasio dependientes de voltaje.

Aunque se ha mencionado anteriormente que la subunidad α contiene los elementos principales de un canal iónico, en el caso de los canales de potasio, que son evolutivamente más primitivos, se necesitan cuatro subunidades α para constituir un canal funcional (Figura 5). Por lo tanto, un canal de potasio completo está formado por un tetrámero de subunidades alfa más las proteínas accesorias.

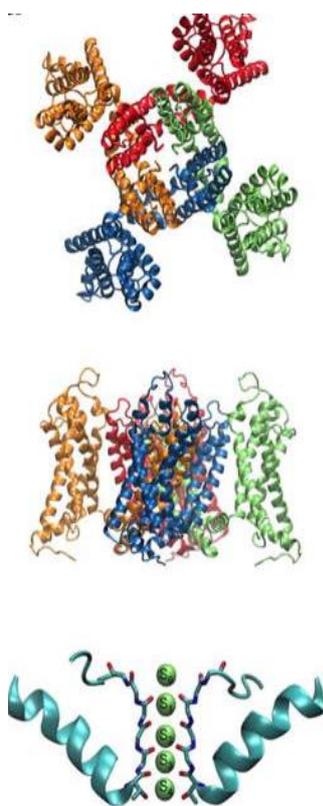


Figura 5. Canal de potasio dependiente de voltaje y filtro de selectividad. Visto desde fuera de la célula (arriba), de lado (medio) y la zona del poro y filtro de selectividad (abajo) (Roux, 2017). Los diferentes monómeros están representados en ocre, verde, rojo y azul. Las S hacen referencia a los iones cruzando el filtro de selectividad.

Cada subunidad alfa está formada por 6 segmentos transmembrana: S1, S2, S3, S4, S5 y S6. Los segmentos del 1 al 4 forman el dominio de sensor de voltaje y los segmentos del 5 al 6 el dominio del poro. El dominio S4 se desplaza y provoca la apertura del poro tirando del segmento S5. El bucle o unión entre los segmentos 5 y 6 es el responsable de formar el poro junto con el resto de segmentos 5 y 6 de las demás subunidades. En ese bucle, se encuentra el filtro de selectividad del canal (Figura 6) (Chiamvimonva *et al*, 2017; Gonzalez *et al*, 2012; Horn, 2000).

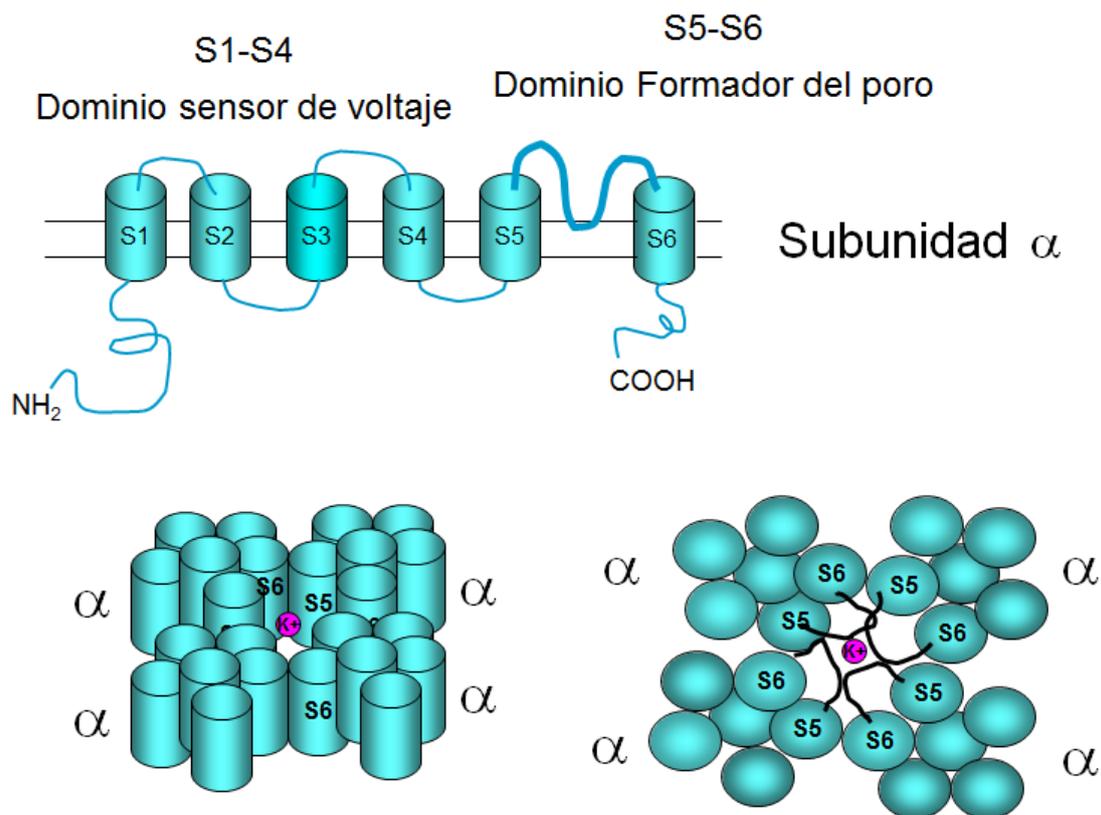


Figura 6. Estructura de un canal de potasio dependiente de voltaje. Esquema de los segmentos que forman una subunidad alfa y canal completo formado por 4 de ellas.

Dentro del poro el filtro de selectividad se estrecha hasta el punto en el que un ion de potasio apenas puede cruzarlo. En el filtro de selectividad se conocen 4 sitios de unión para el potasio (Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Ortega-Sáez *et al*, 2000). Los aminoácidos que forman el filtro disponen sus átomos de oxígeno hacia fuera de la misma manera que lo hacen las moléculas de agua que rodean al potasio. Cuando el potasio entra en el poro,

los átomos de oxígeno sustituyen a las moléculas de agua del ion que recupera una vez cruza el filtro (Figura 7) (Zhou *et al.*, 2001).

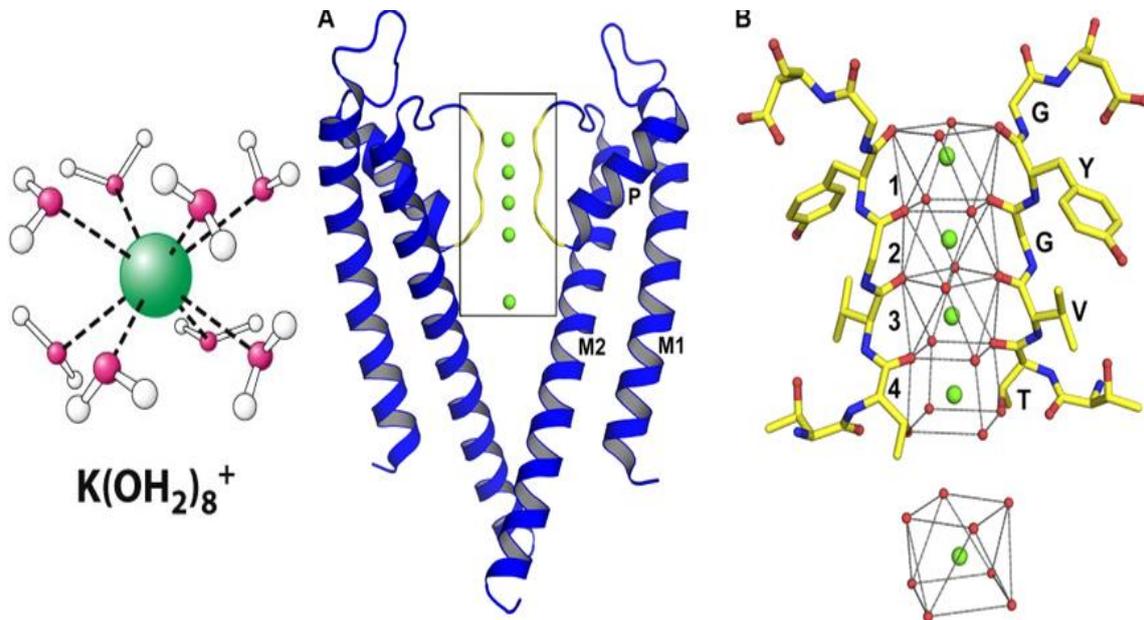


Figura 7. Mecanismo de entrada de un ion de potasio en el filtro de selectividad. Canal de potasio rodeado de una capa de moléculas de agua (izquierda), filtro de selectividad en el bucle S5-S6 (A) y ampliación del filtro de selectividad en la que se muestra un ion de potasio cruzando el poro (B). En los 4 puntos de unión átomos de oxígeno, en rojo, sustituyen a las moléculas del agua que rodean el ion, las cuales recupera al cruzar el filtro (Kuang *et al.*, 2015).

2.1.1 Activación de los canales de potasio

En los canales de potasio el mecanismo de activación o apertura ha generado controversia, proponiéndose 2 modelos de apertura. Por un lado, el grupo de Francisco Bezanilla, propone que el segmento S4 tiene la capacidad de desplazarse desde la zona intracelular hacia la extracelular facilitando la apertura del poro (Figura 8) (Bezanilla, 2002).

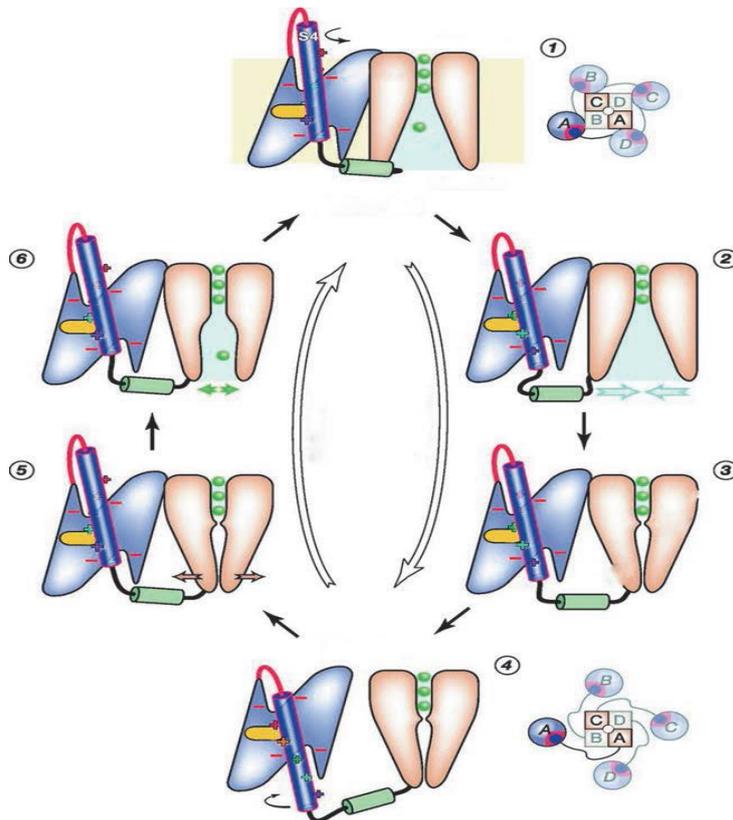


Figura 8. Apertura de un canal de potasio dependiente de voltaje según el modelo de Bezanilla. El segmento S4 se desplaza de dentro a fuera y tira del S5 mediante el linker S4-S5 (Grizel *et al*, 2014). El dibujo 1 muestra el canal abierto. 2 y 3 muestran como el canal se cierra mediante un movimiento del S4 hacia dentro de la membrana que finalmente alcanza el cierre del canal en el dibujo 4. Desde este estado, los dibujos 5 y 6 muestran como el desplazamiento, esta vez hacia la cara extracelular, del S4 tira de las compuertas de apertura abriendo el canal.

Por otro lado, el modelo de la pala que propone Roderik MacKinnon postula que cuando el canal está cerrado los segmentos S1-S2 están inmersos en un ambiente lipídico, mientras que el S4 junto a un fragmento del S3 se encuentran en la interfase, formando una unidad compacta llamada “pala”. Cuando la membrana se despolariza, la “pala” se traslada de la cara interna a la externa de la membrana, la atraviesa completamente y arrastra al S5 y abriendo el poro. (Dorothy *et al.*, 2005; Jiang *et al*, 2003; Jiang *et al*, 2003) (Figura 9). Aunque parece ser que de entre los dos modelos el más aceptado es el de Bezanilla y el movimiento del S4 hacia la zona extracelular (MacKinnon, 2003)

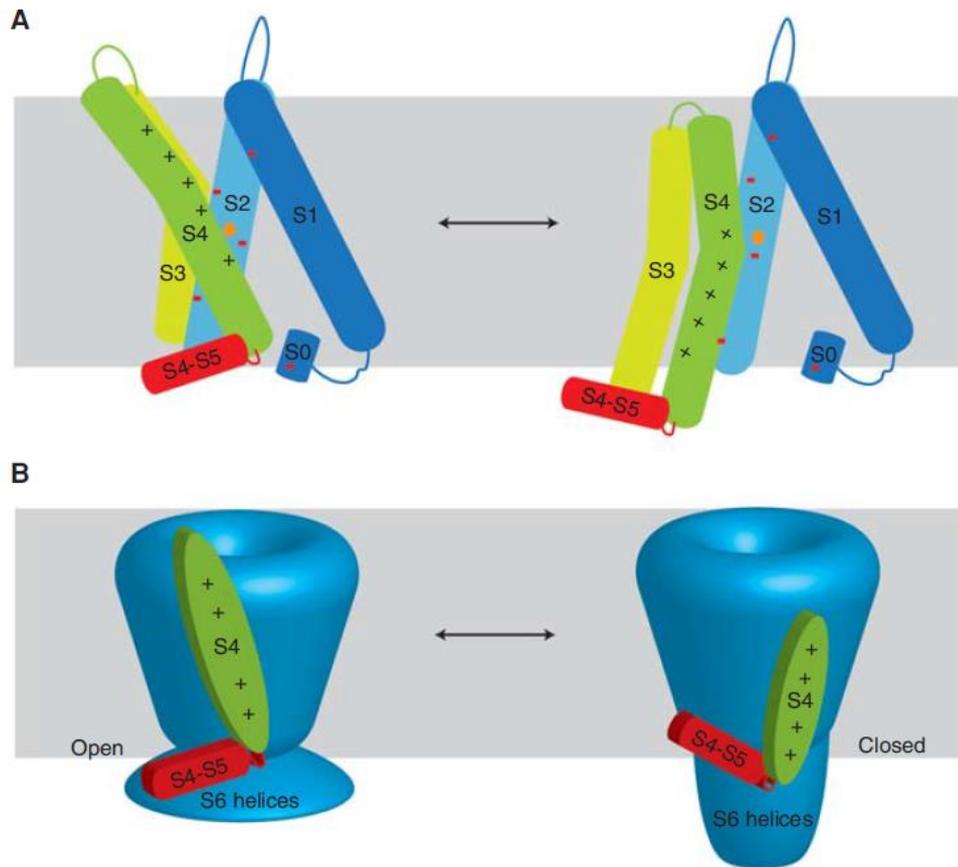


Figura 9. Apertura de un canal de potasio dependiente de voltaje según el modelo de MacKinnon. Distribución de los segmentos en la membrana lipídica, se muestra como cuando el S3 y S4 se desplazan hacia fuera el poro se abre (A). La estructura formada por los segmentos S3 y S4 forma la “pala” que se mueve para abrir el poro (B).

Estos dos modelos explican el mecanismo de apertura de las familias de canales Kv1 a Kv9. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que los canales Kv10 y Kv11 se comportan de una manera diferente (Lörinczi et al., 2015). En estos canales, entre los que se encuentra el canal hERG (Kv11.1), el movimiento no se transmite desde el S4 al S5 a través del linker S4-S5, sino que es independiente del mismo. Se podría expresar que el movimiento del S4 arrastra directamente al S5, provocando su apertura (Barros et al., 2019; Barros et al., 2020) (Figura 10).

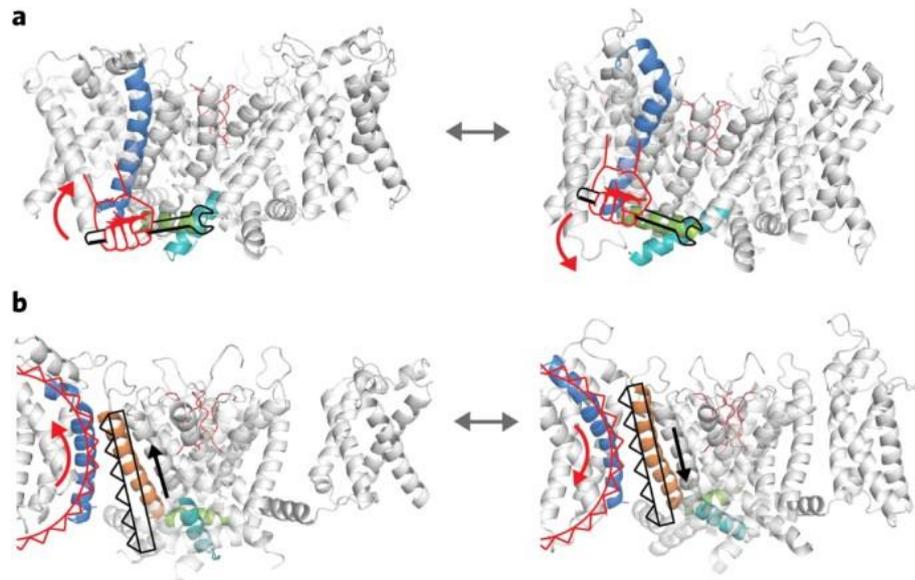


Figura 10. Modelo de apertura de canales Kv10 y Kv11. A) En el modo canónico, el segmento S4 (azul oscuro) actúa como una palanca que mueve el linker S4-S5 (verde), reajustando la parte inferior de del segmento S6 (azul claro). **B)** El movimiento del segmento S4 actúa como una rueda dentada que cambia directamente la posición del S5 vecino. (Fernández-Mariño et al., 2018)

2.1.2 Inactivación de los canales de potasio

La inactivación de los canales de potasio consiste en el cierre del poro, lo que impide el paso de iones (Kuang *et al*, 2015). Para la inactivación de los canales de potasio, existen dos mecanismos aceptados, la inactivación tipo N y tipo C (Figura 11).

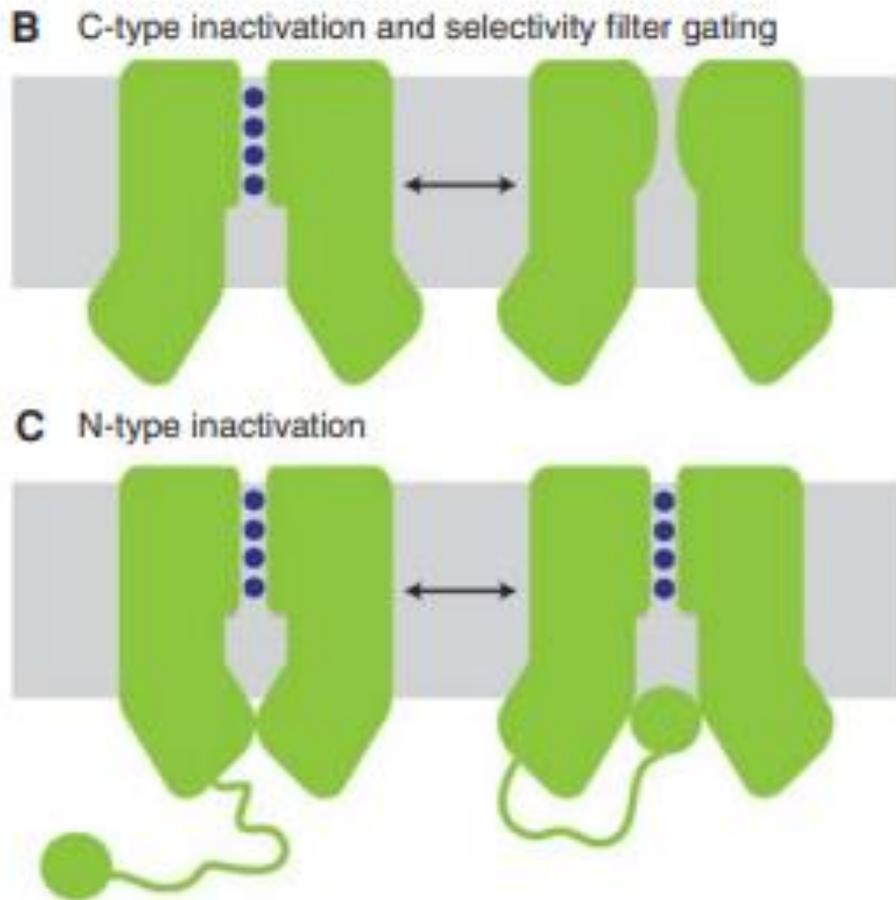


Figura 11. Mecanismos de inactivación de los canales de potasio. Inactivación tipo C (arriba) y tipo N (abajo) (Modificado de Kim & Nimigean, 2016)

La inactivación tipo N, también conocida como modelo de bola y cadena, consiste en una oclusión del poro producida por el extremo N terminal situada al final del S6 de la subunidad alfa que se encuentra en la parte intracelular. De este modo, el canal se tapona y no puede conducir corriente. Es un mecanismo de inactivación rápido. (Grizel et al, 2014; Kim & Nimigean, 2016). La inactivación de tipo C, conocida como colapso del poro, no hay ningún tipo de oclusión mediada por el extremo N terminal. En este modelo, la inactivación requiere de la parte extracelular de S6 y que no haya iones de potasio unidos al filtro de selectividad, el cual actúa también como compuerta. De este modo, el cierre se produce en la parte extracelular del poro cuando la parte extracelular del poro de los 4 monómeros se juntan estrechando el poro (Roux, 2017, Grizel et al, 2014). Un ejemplo de este mecanismo de inactivación es el canal hERG.

2.1.3 El estado de reposo en los canales de potasio

Después de inactivarse, los canales vuelven al estado de reposo y están otra vez listos para volver a abrirse frente a una despolarización. Este cambio de estado va a depender de tiempo y de voltaje. Los voltajes repolarizantes (más negativos) facilitan el paso de estado inactivo a reposo, ya que cuando la membrana deja de estar despolarizada no hay ningún tipo de fuerza que mantenga el estado inactivo y el canal vuelve a su posición original quedando susceptible a activarse frente a un nuevo estímulo (Ortega-Sáez *et al.* 2000).

2.2. Canales de Sodio y Calcio.

Estos dos tipos de canales comparten elementos con los canales de potasio y es que ambos tienen subunidades accesorias que modulan las propiedades y la función de la subunidad α . En los dos canales, la subunidad alfa está dividida en 4 segmentos (I, II, III y IV) y a diferencia de los canales de potasio no necesitan formar un tetrámero ya que es el mismo monómero el que se pliega para formar el canal completo. La cantidad de subunidades α y cantidad y tipo de subunidades accesorias es diferente en ambos tipos de canales (Robert *et al.*, 2005; Catterall *et al.*, 2015; Catterall *et al.*, 2020). Los canales de sodio están formados por una o dos subunidades alfa y subunidades accesorias β_1 y β_2 . Por el contrario, los canales de calcio tienen una única subunidad alfa y subunidades accesorias α_2 , δ y β (Figura 12).

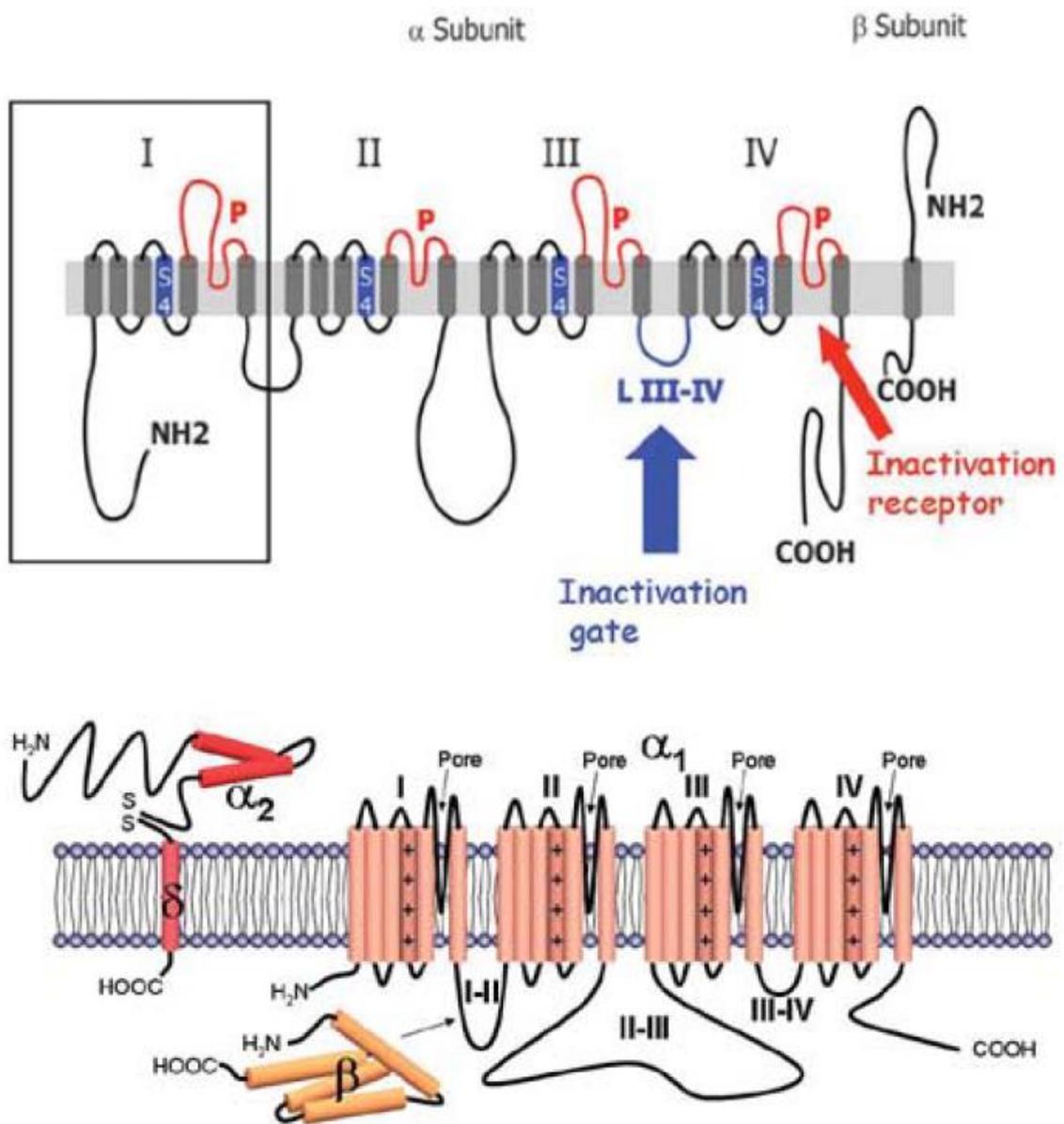


Figura 12. Estructura básica de los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje. Canales de sodio (arriba) y calcio (abajo). En ambas figuras se observan las subunidades α con 4 segmentos cruzando la membrana celular y las subunidades accesorias de cada canal (Modificada de French & Zamponi, 2005).

3. El Canal de potasio Kv11.1 o hERG

El gen KCNH2 o hERG (*human ether-a-go-go related gene*) codifica las subunidades α del canal KV11.1, responsable de la corriente rectificadora tardía rápida de potasio en humanos (Sanguinetti *et al*, 1995; Trudeau *et al*. 1995). En este proyecto de tesis nos referiremos a este canal y su corriente como canal y corriente hERG. Este canal es uno de los miembros de la subfamilia de canales eag (*ether-a-go-go*) junto con hERG2 y hERG3 (Vardenberg *et al*, 2012).

El canal hERG dispone de dos regiones que son importantes para su regulación: El dominio PAS en el extremo N-terminal y el dominio CNBD en el extremo C terminal (Figura 13). Además, sus dos subunidades accesorias, Mink y MirP1 interactúan con el canal mediante el dominio CNBD (Cui *et al*, 2001; Foo *et al*, 2015).

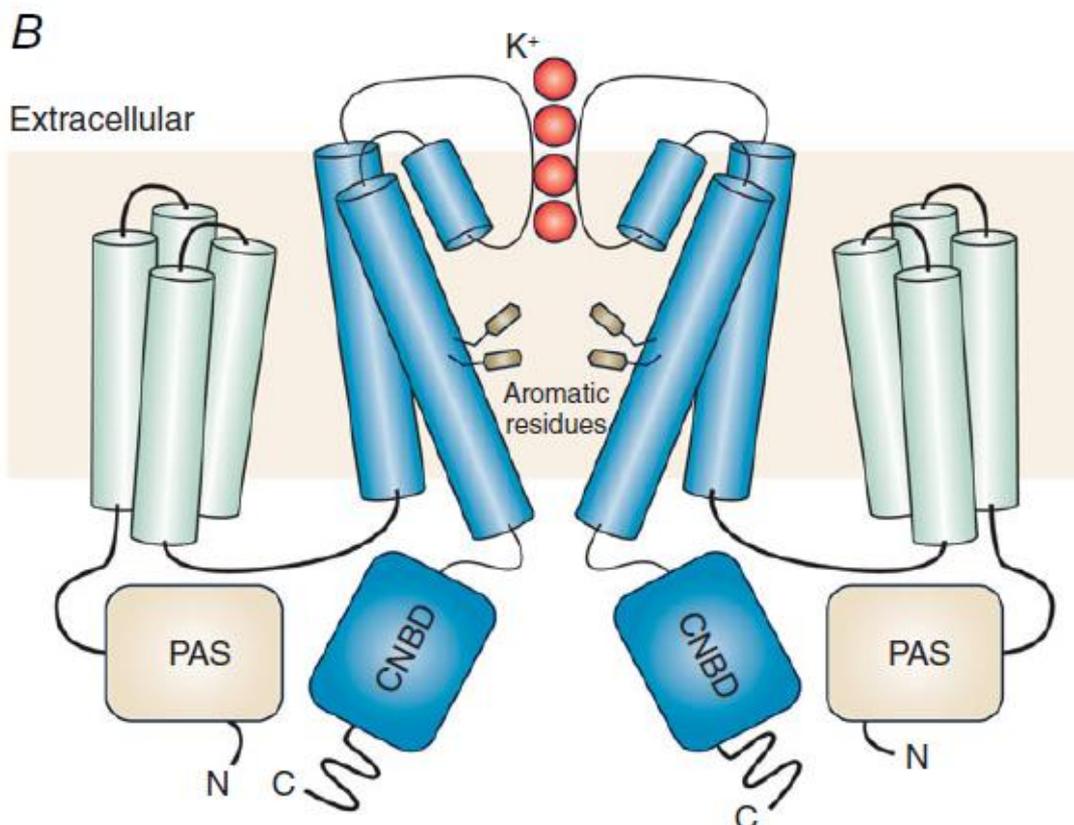


Figura 13. Estructura del canal hERG. Se observan dos monómeros de un canal completo. Al inicio del extremo N terminal se sitúan en orden el dominio PAS, los segmentos S1, S2, S3 y S4 en color azul claro y los dominios S5 y S6 en azul oscuro y al final el dominio CNBD junto al extremo C terminal. Dentro del poro se observan 4 iones de potasio en el filtro de selectividad (Foo *et al*, 2015).

3.1 Síntesis y degradación del canal hERG.

Una vez sintetizada, para que la proteína hERG sea funcional el extremo N-terminal debe ser glicosilado en dos ocasiones, la primera sucede en el retículo endoplásmico y la proteína hERG obtiene un peso molecular de 135 KDa. Para terminar de madurar y expresarse en la membrana es glicosilado de nuevo en el aparato de Golgi, y alcanza un peso de 155 KDa (Vaddi *et al*, 2019; Shawn *et al*, 2018 Foo *et al*, 2015).

En el retículo endoplásmico, además de la primera glicosilación y el ensamblaje de las subunidades alfa que forman el canal completo, se encuentra la maquinaria de control de calidad de hERG (Lamothe *et al*, 2018). Esta maquinaria está compuesta por complejos proteicos que se encargan del correcto plegamiento de las proteínas llamadas chaperones. Además de ello, cuando una proteína no está bien plegada, el chaperón ubiquitina se une a la proteína y la envía al proteasoma donde se degrada. En el caso de hERG los chaperones encargados de su control de calidad son las proteínas Hsp70 y Hsp90 (Figura14). Los canales hERG que residen en la membrana pueden ser internalizados mediante vesículas de endocitosis. Este proceso puede tener dos resultados: El canal puede ser reciclado y enviado de nuevo a la membrana o bien ser digerido vía autofagia o vía proteasoma (Gong *et al*, 2005; Chapman *et al*, 2005; Sun *et al*, 2011) La cantidad de canales funcionales en membrana dependerá del balance entre el tráfico a membrana y la degradación de los mismos y tiende a caer a la mitad en aproximadamente 11 horas (Steele *et al*, 2007; Ficker *et al*, 2003).

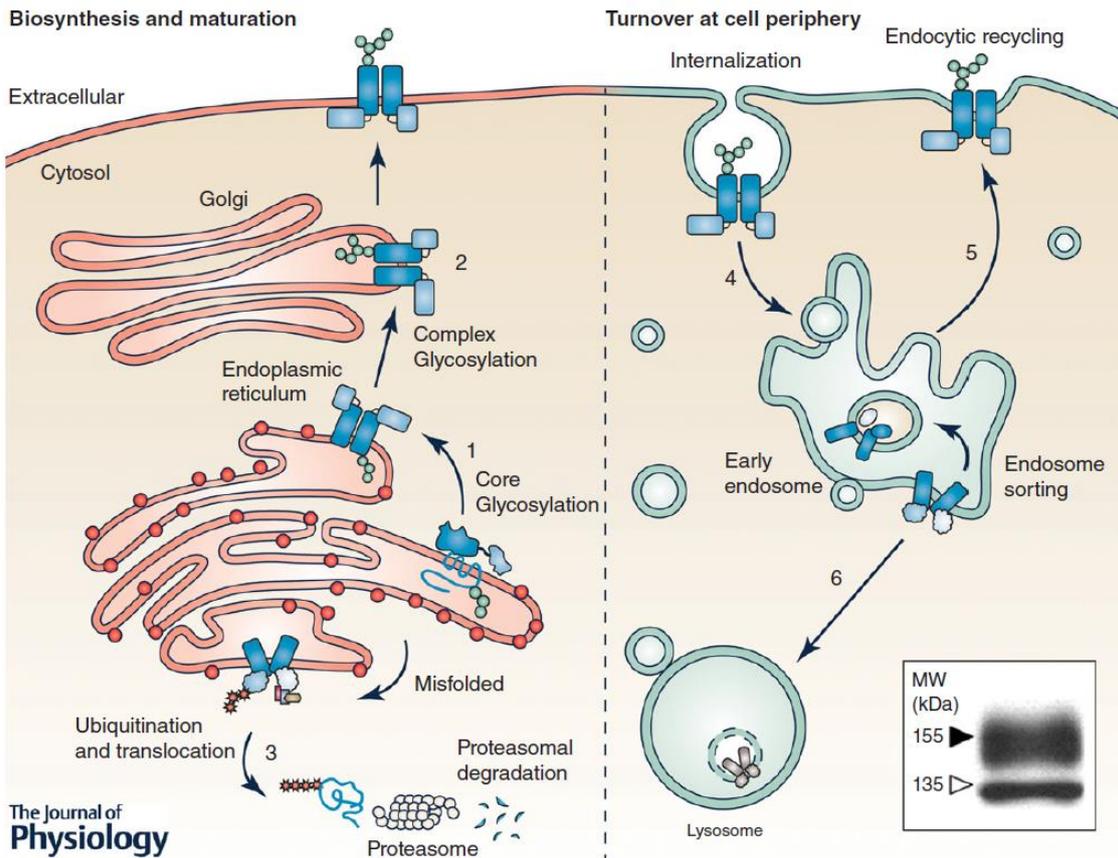


Figura 14. Biosíntesis, maduración, tráfico a membrana e interlaización del canal hERG. El mRNA de canal se traduce en la proteína hERG. Si el plegamiento es correcto, el canal procede a ser glicosilado por primera vez (1) y enviado al aparato de Golgi para la segunda glicosilación con la que madura y se transloca a la membrana (2). Si el plegamiento no es correcto, se ubiquitina y se transloca al proteasoma para su degradación (3). El canal es internalizado mediante vesículas de endocitosis y enviado al lisosoma (4). Desde aquí puede ser reciclado y translocado a membrana (5) o puede ser degradado por el lisosoma (6) (Foo *et al*, 2015).

3.2 Funcionamiento del canal hERG

El canal hERG presenta ciertas características que no se observan en la mayoría de los canales de potasio dependientes de voltaje. En primer lugar, la activación y la inactivación son procesos independientes entre sí y dependientes de voltaje y, en segundo lugar, la deactivación del canal hERG es más lenta que la de otros canales. La inactivación es más rápida a medida que el potencial de membrana se despolariza, es decir, a voltajes más positivos. En segundo lugar, en condiciones fisiológicas no existe el paso del estado inactivo al estado de reposo, sino que este canal tiene que pasar obligatoriamente por el estado activo

para poder volver a reposo. La activación del canal hERG requiere del cambio de conformación de los 4 monómeros mientras que para la inactivación, es suficiente con que uno de ellos cambie de conformación (Figura 15) (Thomsom *et al*, 2014).

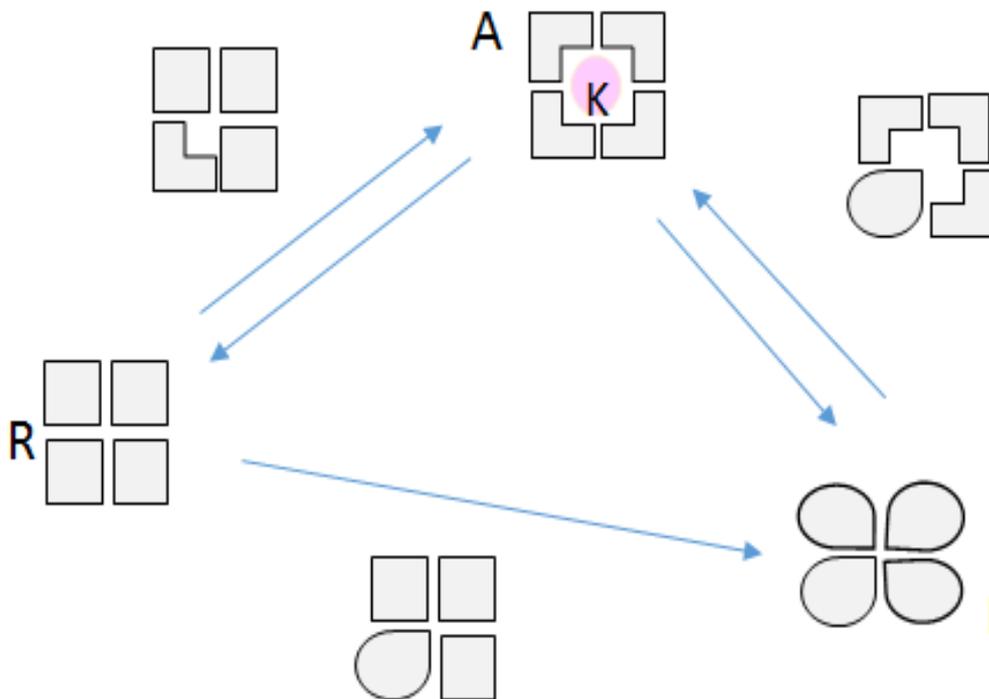


Figura 15. Cambio de conformación de los monómeros del canal hERG. Desde el reposo (R) los monómeros del canal comienzan a cambiar de conformación. Solo cuando los cuatro monómeros han cambiado de conformación el canal se activa completamente (A) y permite el paso de iones de potasio. Para la inactivación (I) basta con que uno solo de los monómeros cambie de conformación.

Una vez en el estado inactivo, el canal hERG vuelve a reposo pasando obligatoriamente por el estado activo lo cual es de gran importancia para la repolarización humana. La vuelta al estado de reposo o deactivación del canal hERG es lenta y dependiente de tiempo (Sanguinetti *et al*, 1995)

3.3 El papel del canal hERG en el potencial de acción ventricular.

En los ventrículos el canal hERG es responsable de generar la I_{Kr} y participa en la fase 3 del potencial de acción. El hecho de que el canal hERG tenga que pasar por el estado abierto para volver al estado de reposo es una característica fundamental para una correcta repolarización ventricular. En la fase inicial del potencial de acción el potencial de membrana alcanza valores positivos rápidamente debido a la rápida entrada de sodio, lo que aumenta la velocidad de inactivación del canal hERG y por lo tanto la mayoría de canales hERG alcanzan el estado inactivo sin haberse activado. A medida que la membrana se repolariza, los canales hERG que salen del estado inactivo para volver a reposo pasan obligatoriamente por el estado activo y debido a su lenta deactivación se mantienen abiertos durante toda la fase de repolarización. (Fernández-Trillo *et al*, 2011; Butler *et al*, 2019).

Una reducción de la corriente I_{Kr} en el corazón humano puede implicar un alargamiento del potencial de acción y un alargamiento del intervalo QT del electrocardiograma, suponiendo un riesgo de aparición de arritmias, las cuales pueden ser letales. El alargamiento del intervalo QT como consecuencia de una reducción en la I_{Kr} se conoce como síndrome de QT largo tipo 2 (LQTS2), y genera en los pacientes que la padecen lo que se conoce como un sustrato de arritmias, el cuál frente a un desencadenante, como una sobreactivación simpática, puede desencadenar arritmias cardiacas, entre ellas, la torsión de puntas (Figura 16) (Sanguinetti *et al*, 2006).

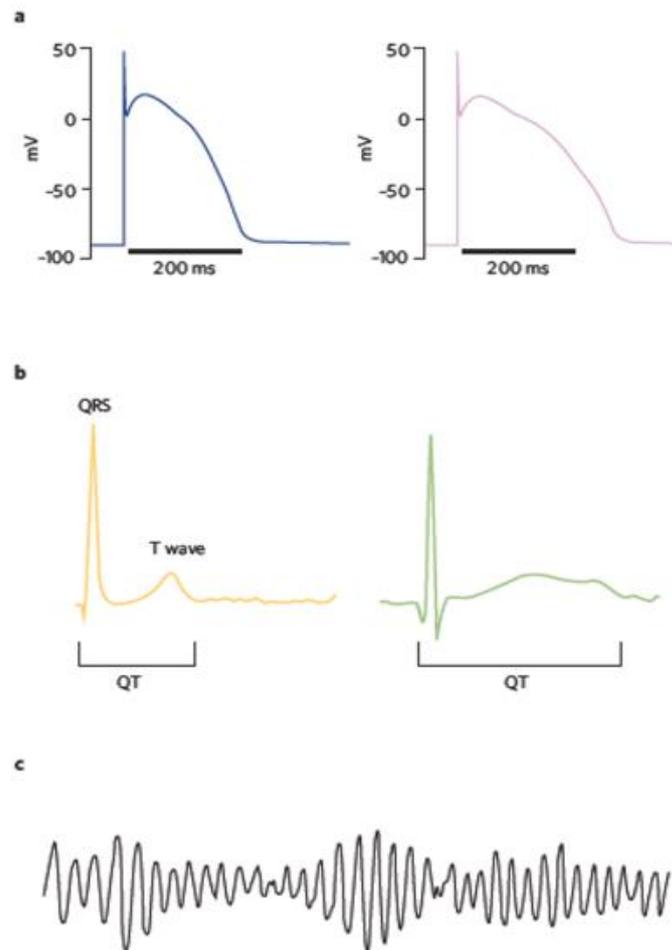


Figura 16. Alargamiento del potencial de acción por la reducción del canal hERG y síndrome de QT largo. A) Comparativa de potencial de acción normal (izquierda) y potencial de acción con la corriente hERG reducida (derecha). Se puede observar un alargamiento de la duración de la fase 3. **B)** Comparativa de un electrocardiograma normal (izquierda) y electrocardiograma con el intervalo QT alargado. El alargamiento del intervalo QT coincide con el alargamiento observado de la fase 3 del potencial de acción. **C)** Electrocardiograma en el que observa una torsión de puntas, un tipo de arritmia que cuando se produce siempre va precedida de un latido con el intervalo QT alargado (Sanguinetti *et al*; 2006).

De las mutaciones que producen el LQTS2 aproximadamente el 90% son mutaciones missense, que consisten en un único cambio de aminoácido, y afectan al tráfico a la membrana del canal. Una reducción leve (30%) no tendrá un efecto notable en la repolarización mientras que una reducción grave (70%) aumentará considerablemente la duración de la repolarización y supondrá un mayor riesgo de aparición de arritmias (Figura 17). El nivel de reducción de la corriente es específico de cada mutación (Smith *et al*, 2016). Además de las

mutaciones algunas toxinas que bloquean el canal también pueden producir LQTS2 como son el veneno del escorpión *Centruroides noxius* o *Buthus eupeus* de los que posteriormente se han aislado péptidos como herramientas para el estudio del bloqueo de hERG (Jiménez-Vargas *et al*, 2012).

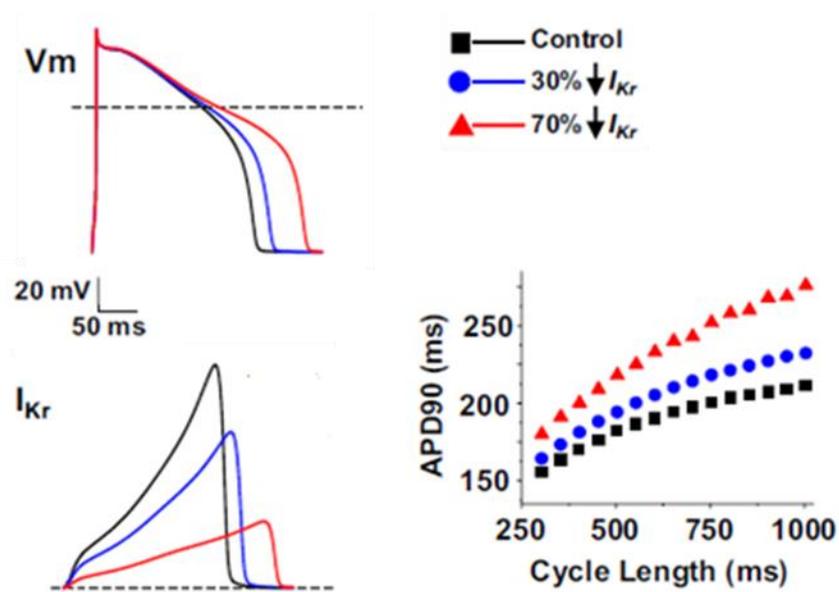


Figura 17. Comparación de potenciales de acción en condiciones control, con una reducción de la corriente I_{Kr} del 30% y una reducción del 70%. Se observa como la duración del potencial de acción al 90% de la repolarización (APD90) se alarga más cuanto mayor es la reducción de la corriente I_{Kr} (Modificado de Smith *et al*, 2016).

3.4 Moduladores del canal hERG.

En el canal hERG, como en otros canales de potasio, existen zonas de unión para diferentes sustancias que pueden actuar como moduladores, y alterar el comportamiento del canal. Esas sustancias pueden ser activadores, aumentando la corriente o bloqueadores, haciendo lo contrario.

3.4.1 Activadores de hERG

Los activadores de hERG, son sustancias que se unen al canal y aumentan la corriente mediante diferentes mecanismos. Según la región del canal a la que se unen y el mecanismo por el cual aumentan la corriente, se pueden distinguir los siguientes grupos (Figura 18) (Perry *et al*, 2010).

Falicitadores del bloqueo

Este grupo está formado por algunos fármacos antiarrítmicos que aumentan la corriente a voltajes negativos. Los facilitadores se unen al segmento S6 del canal y desplazan la dependencia de voltaje de activación hacia la izquierda, es decir, se activan más canales a voltajes más negativos. Sin embargo, a medida que el canal se abre, permiten la unión de la droga al poro y se termina convirtiendo en bloqueadores a voltajes positivos.

Activadores de tipo 1.

Los activadores de tipo 1 se caracterizan por aumentar la corriente dificultando la inactivación y provocando un alargamiento de la duración de la deactivación (vuelta a reposo). Un ejemplo de activadores de tipo 1, es el RPR260243 (Perry *et al*, 2009). Los activadores de tipo 1 hacen su efecto uniéndose al final de los segmentos S5-S6. De este modo, se dificultan los cambios conformacionales necesarios para la inactivación y la deactivación.

Activadores de tipo 2.

El segundo mecanismo es más visible en mutantes de hERG que no presentan inactivación. Un ejemplo de estos activadores son RPR260243 (Zhou *et al*, 2005) y NS1643 (Casis *et al*, 2006). los activadores de tipo 2 se une al segmento S6 en una región cercana al poro. Esa unión interfiere en la interacción entre el poro y el filtro de selectividad, lo cual evita la inactivación y estabiliza el poro en la conformación abierta.

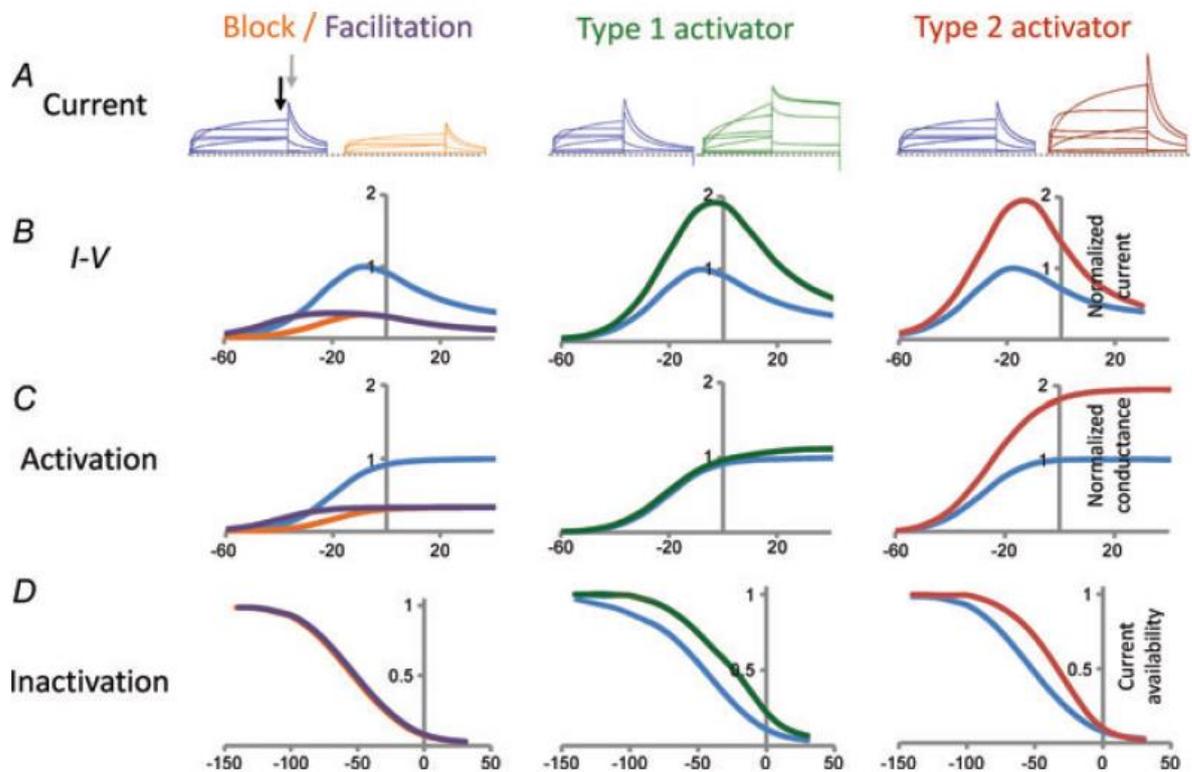


Figura 18. Tipos de activadores y sus efectos en diferentes parámetros de la corriente hERG. Efecto de los activadores en **A)** el registro de corriente hERG, **B)** la amplitud de corriente hERG, **C)** la dependencia de voltaje de inactivación y **D)** la dependencia de voltaje de inactivación del canal (Perry *et al*, 2010).

3.4.2 Bloqueantes de hERG.

A diferencia de los activadores, los bloqueantes de hERG son sustancias que se unen al canal y reducen la corriente. Esto pueden hacerlo de dos maneras: pueden taponar el poro directamente o, por otro lado, unirse a la zona interna cerca del sensor de voltaje y evitar los cambios conformacionales necesarios para la apertura del canal. Ejemplos de bloqueantes son la terfenadina, un antihistamínico, o ErgTx1 y BeKm-1, extraídas del veneno de algunos escorpiones. Los bloqueantes de hERG se usan en investigación para el mejor entendimiento del funcionamiento del canal (Du *et al*, 2009; Jiménez-Vargas *et al*, 2012).

3.5 Vías intracelulares que regulan a hERG

Además de la regulación mediante la unión de sustancias, el canal hERG también se regula mediante vías intracelulares de señalización donde diferentes enzimas se activan secuencialmente para actuar sobre el canal. Una de las vías de regulación más descritas para el canal hERG es mediante receptores adrenérgicos. Se conocen dos tipos: los receptores β adrenérgicos cuya activación aumenta la amplitud de corriente hERG y los α adrenérgicos cuya activación reduce la amplitud de corriente hERG. En cuanto a la regulación β adrenérgica, que está poco descrita, se sabe que la activación del receptor activa a las quinasas PKC y CaMP y estas fosforilan al canal interactuando con el dominio CNBD (Cui *et al*, 2001, Thomas *et al*, 1999). La regulación mediante receptores α adrenérgicos, descrita recientemente en este grupo de investigación, provoca la activación de la proteína $G_{\alpha q}$. Esta proteína activa a la enzima PLC y ésta hidroliza el PIP2 en DAG y IP3. Estos últimos intermediarios activan a PKC y esta fosforila a hERG, regulando así la corriente (Urrutia *et al*, 2016) (Figura 19).

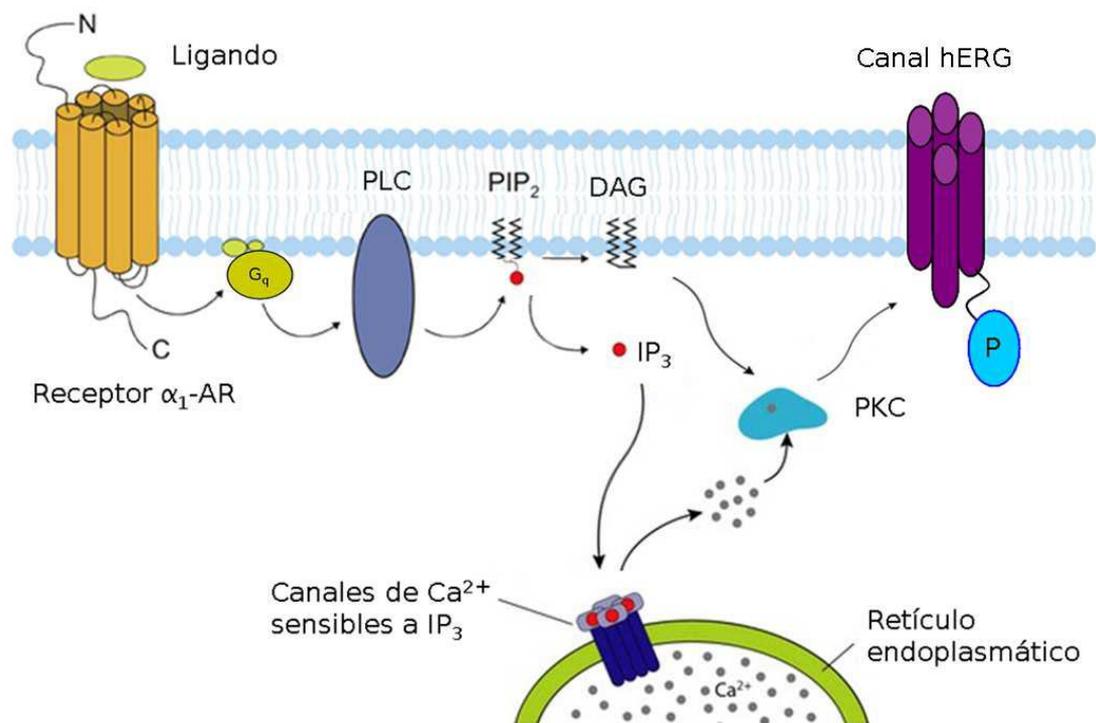


Figura 19. Regulación α adrenérgica del canal hERG. Se observa como la activación del receptor activa a la proteína $G_{\alpha q}$ y ésta activa a PLC, que hidroliza PIP₂ en DAG y IP₃ y estos a su vez a la PKC que fosforila al canal (Urrutia *et al*, 2016)

4. Mammalian Target of Rapamycin o mTOR

La proteína quinasa citosólica mTOR o *mammalian target of Rapamycin* es un complejo multiprotéico que funciona como sensor metabólico celular y que actúa en función del estado energético de la célula. De ese modo, mientras haya nutrientes se mantendrá activo y reducirá su función si la célula se encuentra en déficit de nutrientes. La principal función de mTOR, o la más descrita, es regular la traducción de proteínas e inhibir la autofagia. En otras palabras, en presencia de nutrientes la célula puede permitirse generar nuevas proteínas y, sin embargo, en ausencia de ellos, la célula ahorra recursos y los que necesita los obtiene mediante la autofagia (Sciarreta *et al*, 2018).

El nombre del complejo hace referencia a su principal inhibidor, la Rapamicina, una lactona macrocíclica producida por algunas especies de hongos como *Spreptomyces hygroscopicus*, *S. iranensis* y *Actinoplanes sp.* entre otros. La Rapamicina es la principal herramienta que se usará en este proyecto para modular a mTOR (Young *et al*, 2016).

4.2 Distintos complejos mTOR

Actualmente se conocen dos formas para mTOR, mTORC1 y mTORC2, las cuales se diferencian en las proteínas que lo acompañan. Entre ellas destacan dos: Raptor, que es característico de mTORC1 y Rictor, que forma parte de mTORC2. Ambas proteínas desempeñan una función estructural y de reclutamiento de sustratos y se diferencian en que, en principio, Rictor proporciona al complejo mTORC2 insensibilidad frente a la Rapamicina. Sin embargo, la exposición prolongada a Rapamicina inhibe también a mTORC2 uniéndose a mTOR e impidiendo que forme el complejo (Sarbasov *et al*, 2006)

mTORC1 consta de Raptor, que forma parte del cuerpo del complejo, es donde se une el sustrato y quien ayuda a localizar a mTORC1 a la membrana del lisosoma; mLST8 también como parte del cuerpo y quien tiene función catalítica; PRAS40 y Deptor que tienen función inhibitoria y Tel1/2 que cumplen con la función de andamiaje del complejo. En mTORC2 Rictor también se encarga de unirse al sustrato pero además tiene función catalítica junto con Protor1 y Protor2 y además cuenta con mSin1 como proteína de andamiaje. Al igual que C1, en mTORC2 también se encuentran mLST8, Deptor y Tel2 (Nojima *et al*, 2003; Sancak *et al*, 2008; Peterson *et al*, 2009; Sarbasov *et al* 2005; Jacinto *et al*, 2004) (Figura 20).

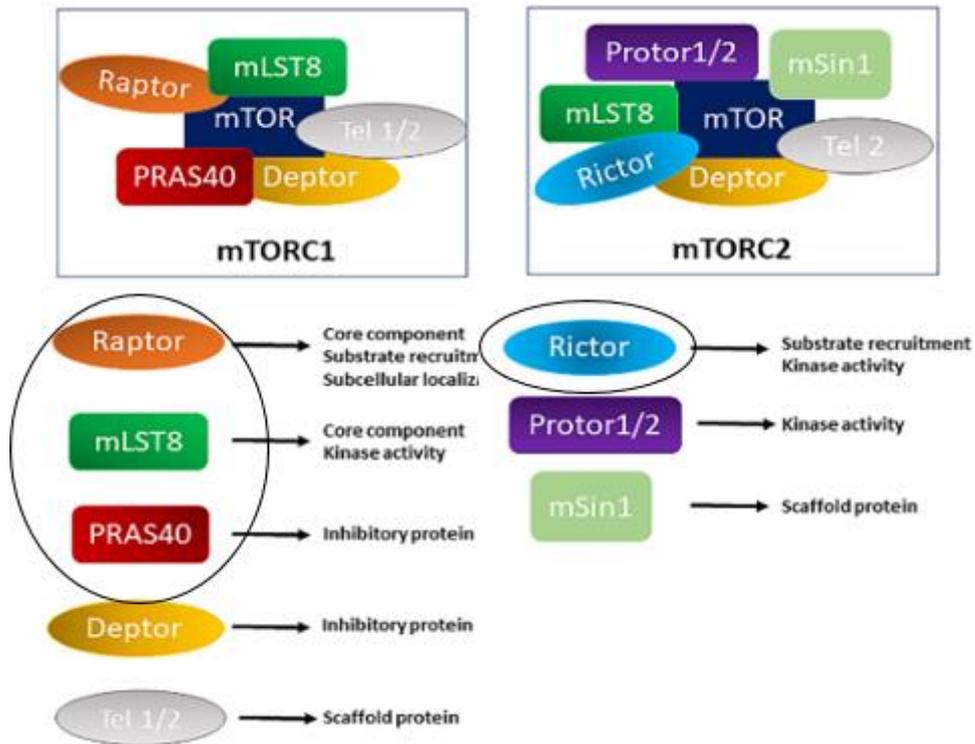


Figura 20. Componentes de los complejos mTORC1 y mTORC2. En la imagen se pueden observar las diferencias de mTORC2 respecto a mTORC1 como la presencia de Rictor en lugar de Raptor, mSin1 como proteína de andamiaje y la ausencia de PRAS40 (Sciarreta *et al*, 2018).

4.3 Vía de activación de mTORC1

mTORC1 localiza principalmente en la membrana del lisosoma que se mantiene activa mientras la célula tenga disponibilidad de nutrientes (Menon *et al*, 2014). Así, mientras que los nutrientes, aminoácidos y factores de crecimiento mantienen a mTORC1 activo, la falta de nutrientes, el estrés oxidativo, la hipoxia o el daño genético lo inhiben (Figura 21). La vía de activación de mTORC1 se integra dentro de la vía de PI3K/AKT, siendo AKT la enzima corriente arriba que activa a mTORC1 (Laplante *et al*, 2009).

4.3.1 Moduladores positivos: Nutrientes, factores de crecimiento y aminoácidos.

mTORC1 se activa en la membrana del lisosoma en presencia de nutrientes, como por ejemplo la insulina. La enzima corriente arriba de mTORC1, AKT (proteína quinasa B), fosforila a PRAS40, uno de los inhibidores internos

del complejo mTORC1, permitiendo que PRAS40 se una al chaperón 14-3-3 y que éste secuestre al inhibidor (Sancak *et al*, 2007; Sekulic *et al*, 2000). Además, las enzimas ERK 1-3 e IKKB fosforilan a TSC1/2, enzima encargada de inhibir a Rheb, una GTPasa encargada de activar a mTOR. La fosforilación de TSC1/2 hace que se separe de Rheb, activando a mTORC1 (Menon *et al*, 2014; Inoki *et al*, 2003). Los aminoácidos también activan a mTORC1 mediante la activación de la encima RAG, que interactúa directamente con Raptor y lo activa (Lee *et al*, 2007).

4.3.2 Moduladores negativos: falta de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia y daño genético.

El proceso de inhibición también puede suceder mediante la interacción directa con mTORC1 o indirectamente mediante otras enzimas. La falta de nutrientes produce una reducción de los niveles de ATP que activa la AMP quinasa (AMPK) y también produce la activación de la enzima GSK3-B. Estas dos enzimas, fosforilan y activan a TSC1/2, inhibiendo así a mTORC1. Además de eso, la AMPK interactúa directamente con mTORC1, fosforilando e inhibiendo a Raptor (Gwinn *et al*, 2008; Inoki *et al*, 2006; Inoki *et al*, 2003). En cuanto a la hipoxia y daño genético, activan otras vías que también activan a TSC1/2. El estrés oxidativo también activa vías que interactúan directamente con mTORC1, sin embargo, estas últimas están aún muy poco descritas (Zhai *et al*, 2011; Brugarolas *et al*, 2004; Roberts *et al*, 2014).

4.4 Vía de activación de mTORC2.

Al contrario de lo que sucede con mTORC1, la vía de mTORC2 está menos caracterizada y es menos conocida. Se sabe, sin embargo, que se activa mediante la quinasa PI3K en presencia de nutrientes como la insulina. Una vez mTORC2 se activa, parece ser que su principal sustrato son otras quinasas. Entre ellas, enzimas de la familia de quinasas AGC, de la cual forman parte, entre otras, AKT, SGK1 y PKC. En cuanto a su relación con mTORC1, parece ser que comparten un feedback negativo, pudiendo así ser inhibida por mTORC1 (Figura 20) (Braz *et al*, 2004; Jacinto *et al*, 2004).

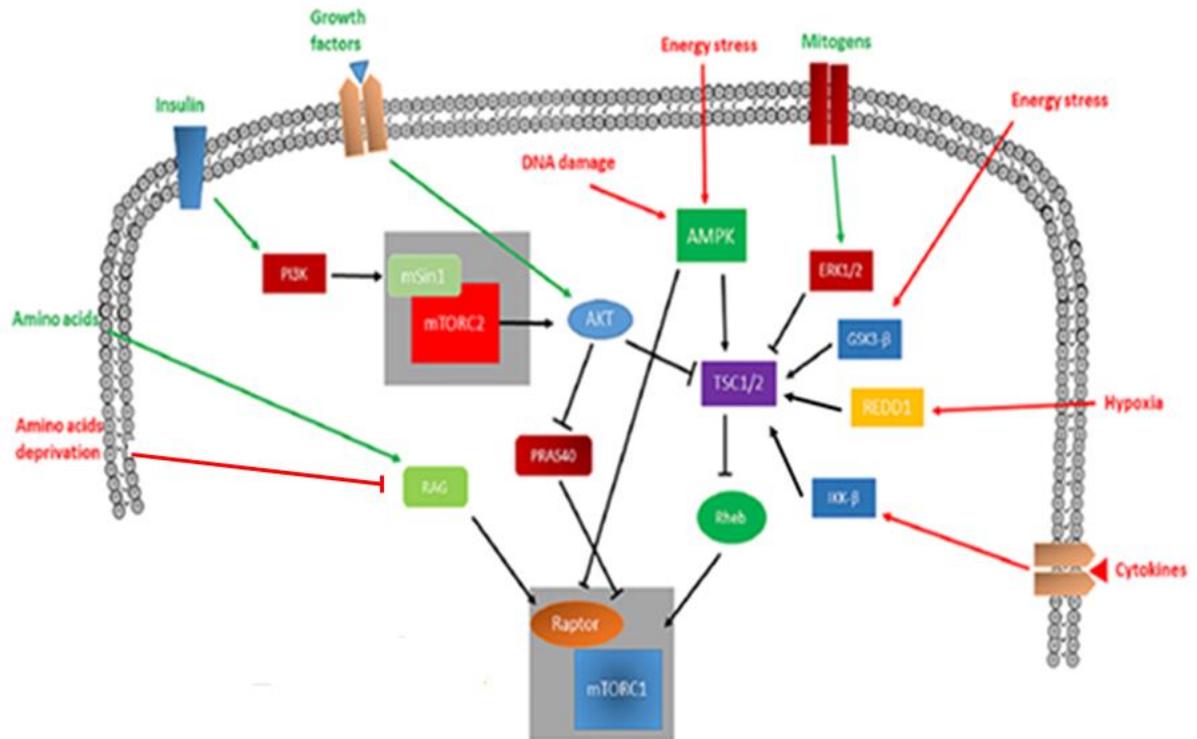


Figura 21. Vía de señalización de mTOR. En verde, moduladores positivos y en rojo los negativos. La insulina y los factores de crecimiento activan la de mTORC1 mediante la activación AKT, que es activada por mTORC2 en el caso de la insulina, y esta inhibe al inhibidor de mTOR PRAS40. Los mitógenos, sustancias que provocan la mitosis de la célula, activan a ERK1/2 que inhiben a TSC1/2 enzima inhibidora de mTORC1. Lo aminoácidos, activando a la enzima RAG y esta fosforila y activa a Raptor. La falta de nutrientes, provocan la activación de la AMPK y de la enzima GSK3- β quienes activan a TSC1/2, inhibidor de mTORC1. Las citoquinas y la Hipoxia también activan a TSC1/2. La falta de aminoácidos afecta directamente a la vía de RAG inhibiéndola (modificado de Sciarreta *et al*, 2018).

4.5 Funciones de mTORC1

El complejo mTORC1 ha sido ampliamente estudiado y sus funciones mejor conocidas son regular la traducción de proteínas, inhibir la autofagia y participar en el control del metabolismo celular.

4.5.1 mTORC1 regula la traducción de proteínas

La activación de mTORC1 regula positivamente la síntesis de proteínas a nivel de traducción (Laplante & Sabatini, 2012; Zhang *et al*, 2010; Tamai *et al*, 2013). La quinasa utiliza principalmente 2 vías independientes (Figura 22). mTORC1 fosforila al factor de transcripción 4E-BP1 en múltiples sitios (Sonenberg *et al*, 2009). Esta fosforilación rompe la interacción entre los factores de transcripción 4E-BP1 y eIF4E. Este último queda libre para unirse al factor eIF4G en el extremo 5' del mRNA, unión necesaria para el reclutamiento de la unidad 40 S del ribosoma y la consiguiente traducción de proteínas (Johnson *et al*, 2013; Wullschleger *et al*, 2006). mTORC1 también fosforila a la quinasa S6K1 en la Thr389. Esta enzima participa en la traducción de proteínas de dos maneras. Una de ellas es la inhibición de PDCD4, regulador negativo de la unión de eIF4B al resto del complejo eIF4, complejo encargado de regular la transcripción uniéndose al extremo 5' del mRNA (Dorrello *et al*, 2006). Además, S6K1 activa a SKAR, enzima que forma parte de los complejos de unión de exones (Ma *et al*, 2008).

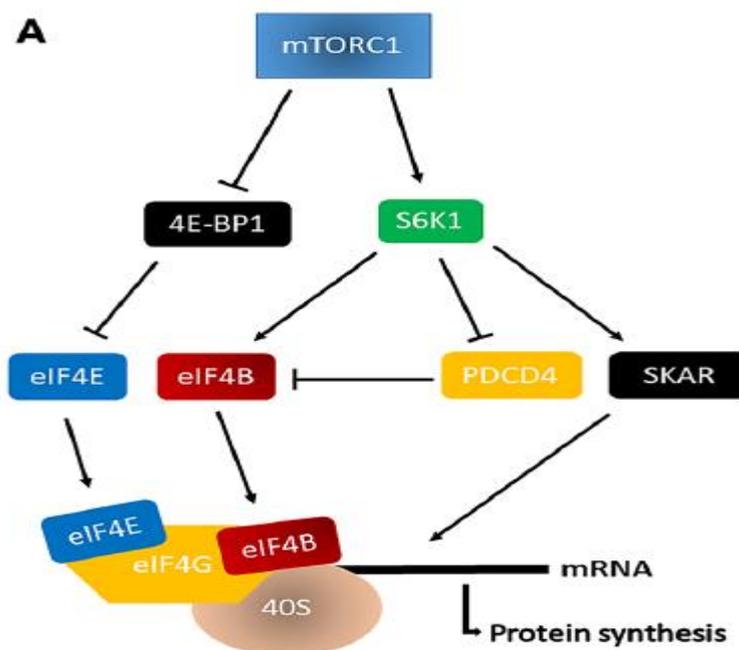


Figura 22. mTORC1 regula la síntesis de proteínas a nivel de traducción. Esquema de la regulación por mTORC1 de la síntesis de proteínas a nivel de traducción (Sciarreta *et al*, 2018).

4.5.2 mTORC1 inhibe la autofagia

La autofagia es un proceso de degradación intracelular mediante lisosomas que se activa en situaciones de falta de nutrientes. La degradación de diferentes elementos como orgánulos o proteínas puede producir nutrientes que la célula puede usar para sobrevivir. Se trata de una secuencia que comienza rodeando el elemento a degradar en una vesícula denominada fagóforo en caso de elementos citosólicos o endosoma si lo que se va a degradar se transporta en una vesícula de endocitosis. La estructura completa de un fagóforo que contiene en su interior material para la degradación se conoce como autofagosoma el cual se fusiona con el lisosoma formando el autofagolisosoma. Finalmente, el autofagolisosoma se encarga de digerir su contenido mediante enzimas hidrolasas (Figura 23) (Mizushima 2007).

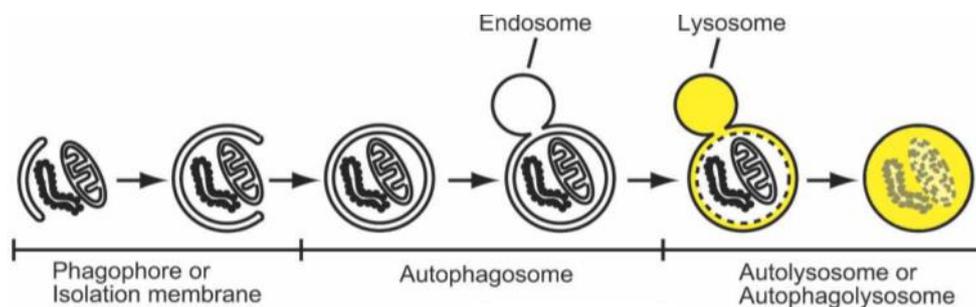


Figura 23. Formación del autofagolisosoma. Se muestra un fagóforo formándose entorno a orgánulos que forman un autofagolisosoma que finalmente degrada los orgánulos. (Modificado de Mizushima 2007).

mTORC1 inhibe la autofagia a dos niveles (Figura 24): Por un lado, a nivel post-transcripcional fosforila e inhibe enzimas que participan en la autofagia. Por otro lado, a nivel transcripcional, inhibe la expresión de los genes relacionados con la autofagia y los lisosomas (Sciarreta *et al*, 2012; Egan *et al*, 2011; Levine *et al*, 2008).

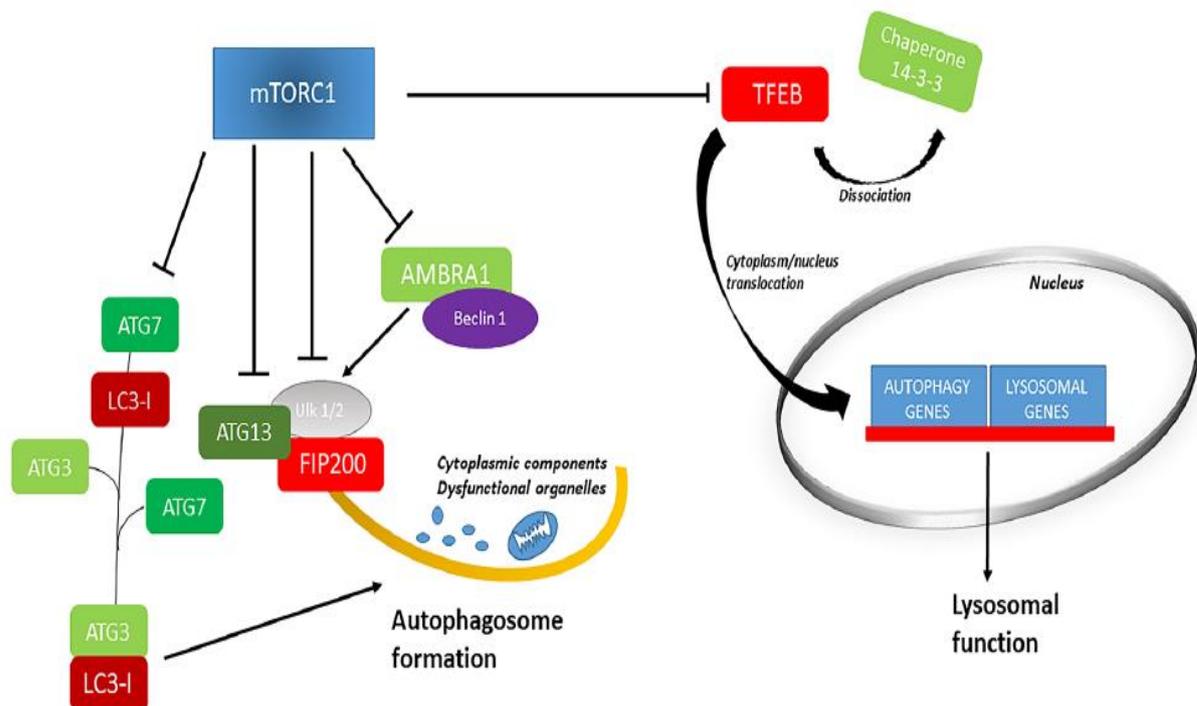


Figura 24. Inhibición de la autofagia por mTORC1. A nivel post-transcripcional (izquierda) regula la formación del autofagolisosoma y a nivel transcripcional (derecha) los genes relacionados con la función lisosomal (Sciarreta *et al*, 2018).

A nivel post-transcripcional, en presencia de nutrientes, mTORC1 inhibe el complejo multiproteico ULK1–ATG13–FIP200 mediante la fosforilación de ULK1 (unc-51-like kinase) y ATG13 (autophagy-related gene 13). Estas enzimas forman parte de la vía de señalización necesaria para la formación del autofagosoma. Además, la fosforilación de ULK1 evita su interacción con AMPK y su activación. mTORC1 inhibe también la autofagia mediante la fosforilación de AMBRA, una ubiquitin-ligasa del complejo proteico Beclin1, necesario para la estabilización de ULK1 (Hosokawa *et al*, 2009; Kim *et al*, 2011; Nazio *et al*, 2013). Además del complejo mencionado anteriormente, mTORC1 inhibe también al complejo PIK3C3/VPS34-AGT14 mediante la fosforilación de AGT14. Este es otro complejo también necesario para la formación del autofagosoma. Finalmente, mTORC1 también inhibe enzimas necesarias para la acidificación del lumen del lisosoma como la bomba de protones v-ATPasa, afectando directamente a la función del lisosoma y, por tanto, a la fusión con el autofagosoma (Ramos *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2013)

Además, a nivel transcripcional, mTORC1 fosforila a TFEB en Ser211, un factor de transcripción que aumenta la expresión de genes relacionados con la autofagia, como el de la proteína ATG7 y algunos genes lisosomales. La fosforilación de TFEB impide su separación de la chaperona citosólica 14-3-3 y su consiguiente traslocación al núcleo (Roczniak-Ferguson *et al* 2012; Martina *et al* 2012; Settembre *et al* 2012).

4.5.3 mTORC1 regula el metabolismo celular

mTORC1 regula el metabolismo celular mediante la fosforilación de varios factores de transcripción que controlan la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, la glucólisis, la biosíntesis mitocondrial y la síntesis de nucleótidos (Sciarreta *et al*, 2018) (Figura 25).

mTORC1 regula el metabolismo de los lípidos mediante la fosforilación del factor de transcripción SREBP1/2 (Laplante & Sabatini, 2009). La fosforilación de SREBP1/2 puede darse de dos maneras. mTORC1 puede fosforilar a SREBP1/2 de manera directa y también puede hacerlo de manera indirecta mediante la fosforilación e inhibición de Lipin-1, regulador negativo de SREBP1/2. La activación de SREBP1/2 promueve el metabolismo de ácidos grasos, la biosíntesis de colesterol y es necesario para la activación de la vía de las pentosas fosfato, ruta que también produce intermediarios para el crecimiento celular (Peterson *et al*, 2011). mTORC1 también puede regular el metabolismo lipídico mediante la activación de la quinasa S6K1, ya mencionada anteriormente. S6K1 fosforila a la sintetasa EPRS en Ser999 y esta regula el metabolismo de los lípidos, aunque el mecanismo está todavía poco descrito (Arif *et al*, 2017). Además, mTORC1 regula el cambio de oxidación de ácidos grasos a glucólisis mediante el aumento de la expresión de HIF-1a, factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con la glucólisis (Düvel *et al*, 2010)

Por último, en cuanto a crecimiento celular, mTORC1 fosforila a YY1/PCG-1a y ATF4, factores de transcripción que regulan genes relacionados con la biosíntesis mitocondrial y la síntesis de nucleótidos respectivamente (Cunningham *et al*, 2007; Ben-Sahra *et al*, 2016).

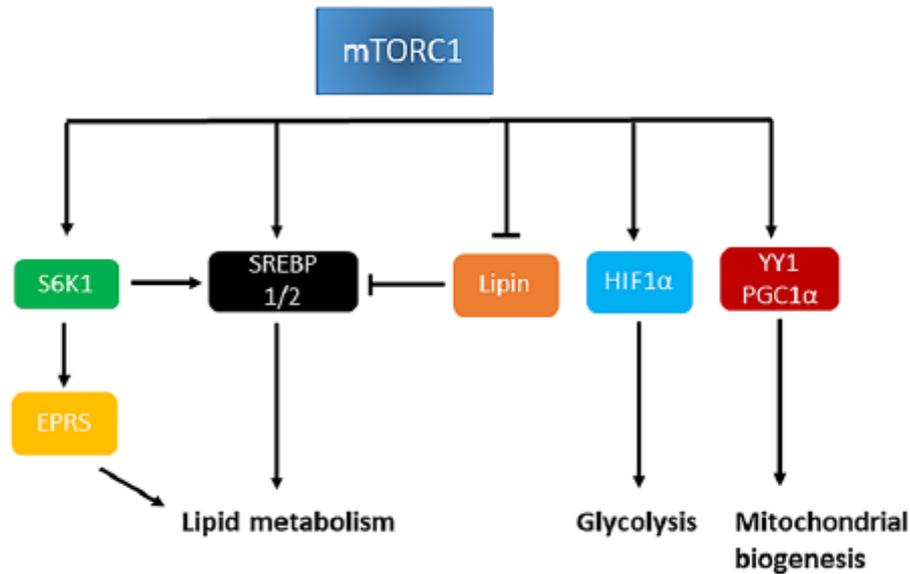


Figura 25. mTORC1 regula el metabolismo de lípidos, glucólisis y biogénesis mitocondrial. mTORC1 regula estas funciones mediante la fosforilación de diferentes factores de transcripción (Sciarreta *et al*, 2018).

4.6 Funciones de mTORC2

A pesar de estar menos caracterizado que el complejo mTORC1, las funciones conocidas de mTORC2 son la regulación de la supervivencia celular y la organización del citoesqueleto (Braz *et al*, 2004; Jacinto *et al*, 2004) (Figura 26). Estas funciones todavía poco descritas se han observado principalmente *in vitro*.

4.6.1 Supervivencia celular

Varias enzimas y vías de señalización, reguladas por mTORC2, relacionadas con la proliferación promueven la supervivencia celular ya que su delección *in vitro* aumenta la apoptosis. mTORC2 fosforila a AKT en la Ser473, lo que promueve su fosforilación en la Thr308 por PDK1 y promueve la supervivencia celular mediante el aumento de la proliferación (Guertin *et al* 2006; Sarbassov *et al* 2005). Además, mTORC2 también fosforila a SGK1 enzima que promueve la supervivencia inhibiendo la apoptosis en cardiomiocitos. Además de vías que promueven la supervivencia celular mTORC2 inhibe enzimas que promueven la muerte celular como MST1, enzima principal de la vía Hippo. La vía Hippo es una vía que promueve la muerte celular mediante la inhibición de

YAP, cofactor que promueve la supervivencia y la proliferación celular (Sciarreta *et al*, 2015; García-Martínez *et al*, 2008; Aoyama *et al*, 2005).

4.6.2 Organización del citoesqueleto

La delección de Rictor en líneas celulares provoca una acumulación de F-actina e inhibe la extensión de pseudopodos. mTORC2 regula la organización del citoesqueleto mediante la fosforilación de PKC- α y la GTPasa Rho. Estas enzimas están relacionadas con la organización del citoesqueleto, la extensión de la célula y la polaridad (Jacinto *et al*, 2004; Sarbassov *et al*, 2004).

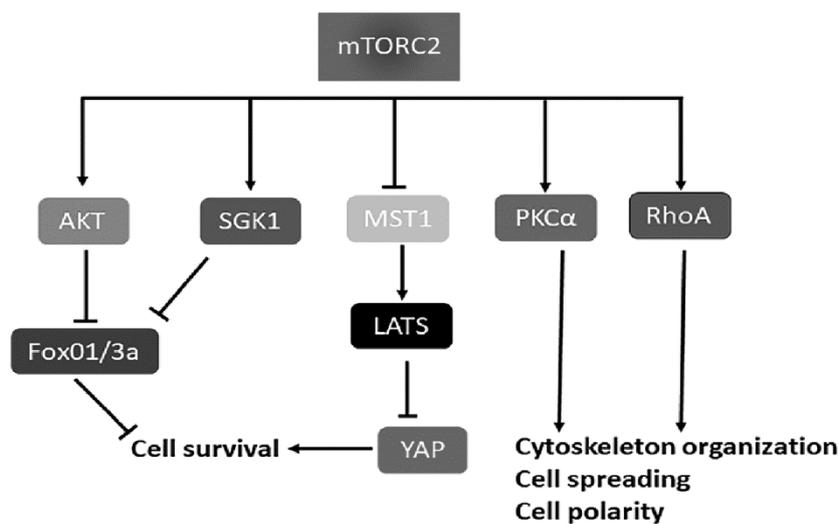


Figura 26. Funciones de mTORC2. mTORC2 regula la supervivencia celular y organización del citoesqueleto mediante la regulación de diferentes enzimas.

4.7 Efecto de mTOR sobre los canales iónicos

A día de hoy, hay pocos trabajos en los que se haya visto una relación directa entre mTOR y los canales iónicos. De esos trabajos se ha concluido, por ejemplo, que la activación de la vía mTORC1 incrementa la densidad de la corriente I_A en neuronas porque aumenta la expresión de los canales Kv4.2, fundamentalmente estimulando la traducción del mRNA (Krenz *et al*, 2014; Yao *et al*, 2013; Yao *et al*, 2013).

Teniendo en cuenta que hormonas como la insulina, o como la leptina secretada por el tejido adiposo; factores tróficos como el IGF-1 hepático; o la noradrenalina liberada por el sistema nervioso simpático; son activadores de

mTOR, niveles anormalmente bajos de estas sustancias podrían causar una reducción del nivel basal de activación de mTOR (Clauson *et al*, 1998; Ezzat *et al*, 2008; Ti *et al*, 2011). Es importante señalar que esos factores mencionados son los mismos que se necesitan para la correcta expresión de canales de potasio cardiacos (Díaz-Asensio *et al*, 2008; Gallego *et al*, *Physiol Res* 2003; Gallego *et al*, 2000; Gómez-Hurtado *et al*, 2014). Esta posible relación entre ambos nos ha llevado a investigar la hipótesis de que mTOR puede regular al canal hERG.

4.8 La Rapamicina como inhibidor clásico de mTOR

En 1964, el grupo de Surendra Nath Sehgal y Claude Vézina realizaba una búsqueda de agentes antifúngicos y descubrió una sustancia producida por *Streptomyces hygroscopicus* que aparentemente mostraba actividad contra *Candida albicans*. Posteriormente, encontraron la misma sustancia en otras especies como *S. iraniensis* y *Actinoplanes sp.* Debido a que la búsqueda y el descubrimiento se realizaron en la isla de Rapa Nui (Pascua), el compuesto encontrado pasó a llamarse Rapamicina (Vézina *et al*, 1975). La rapamicina es una lactona macrocíclica que proviene del precursor metabólico ácido (4R,5R)-4-5-dihydrocyclohex-1-ene-carboxílico (DHCHC) y que la producen algunas especies de *Streptomyces*.

4.8.1 Biosíntesis y mecanismo de acción

El proceso de la formación de la Rapamicina está regulado mediante distintas policétido sintasas (PKS), enzimas involucradas en procesos de síntesis de otros productos naturales. En primer lugar, partiendo de ácido corísmico y lisina se obtienen por un lado el precursor DHCHC y por otro lado pipecolato. En dichos procesos, predominan la PKS RapK para la síntesis de DCHCH y las PKS RapL y RapP para la síntesis de pipecolato. Después, ambos productos se unen a una molécula macrocíclica o policétido formando la pre-Rapamicina. Finalmente, otras PKS (RapA, RapB y RapC) modifican la pre-Rapamicina obteniendo una molécula de Rapamicina funcional (Figura 27) (Aparicio *et al*, 1994; Lowden *et al*, 1996; Gregory *et al*, 2004).

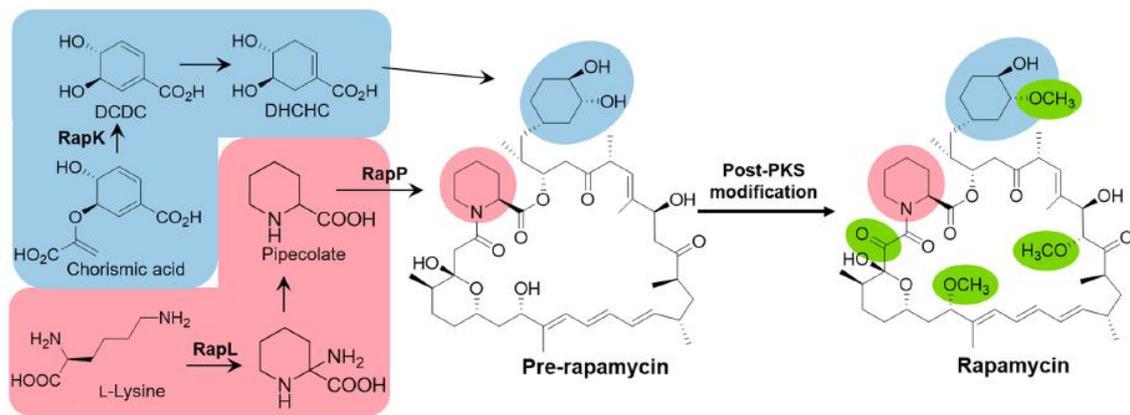


Figura 27. Síntesis de la Rapamicina mediante enzimas PKS. Las PKS RapK, RapL y RapP sintetizan pre-rapamicina a partir de su precursor. Finalmente, mediante otras PKS se produce la Rapamicina. (Ji Yoo *et al*, 2017)

La Rapamicina se une a la proteína FKBP12 formando el complejo FKBP12-Rapamicina, el cual se une a mTOR en el lugar de unión para FKBP12 (Ji Yoo *et al*, 2017). De esta manera, el complejo tapa el lugar de unión a substratos de mTOR y bloquea la zona catalítica, inhibiendo así la actividad de mTORC1. Exposiciones prolongadas (24h) de Rapamicina inhiben a mTORC2. (Figura 28) (Ayllet *et al*, 2016; Yang *et al*, 2013, Sarbassov *et al* 2006)

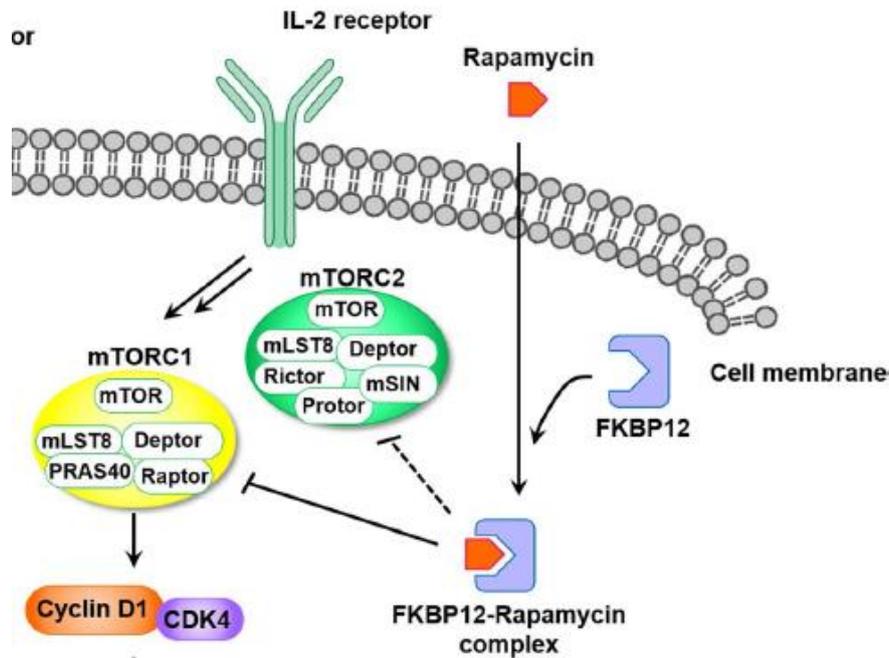


Figura 28. Mecanismo de acción de la Rapamicina y la inhibición de mTOR en células T. El complejo Rapamicina-FKBP12 se une directamente a mTORC1 en el sitio de unión de FKBP12 y lo inhibe. La inhibición de mTORC2 solo se produce con exposiciones prolongadas con Rapamicina, por eso la línea se muestra discontinua (Ji Yoo *et al*, 2017).

4.9 Relevancia clínica de la inhibición de mTOR

Desde su descubrimiento como antifúngico en 1964 hasta el día de hoy, la Rapamicina ha demostrado tener otras funciones o actividades útiles para la medicina.

4.9.1 Actividad antifúngica de la rapamicina

En 1975 se publicó el uso de la rapamicina como antifúngico contra *Candida albicans* y se consiguió la primera patente en US (Vézina *et al*, 1975; Sehgal *et al*, 1975). Entre 1975 y 1978, mediante aislamiento, caracterización y su evaluación *in vivo/in vitro*, se descubrió su efecto contra otras especies como *Cryptococcus formans*, *Candida stelloidea* y *Penicillium sp* (Cruz *et al*, 1999; Odorn *et al*, 1997; Wong *et al*, 1998). Asimismo, entre 1977 y 1978 se descubrió también que es eficaz contra *Mucor circinelloides*, microorganismo causante de cocomicosis en trasplantes. El efecto se testó en un modelo animal de polilla

Galleria mellonera, en el cual se observó que mejoraba en un 50% la supervivencia del insecto. Ese experimento fue el primero donde se demostró que el efecto de la Rapamicina se producía vía inhibición de TOR, el ortólogo de mTOR en hongos (Bastidas *et al*, 2012).

4.9.2 Actividad inmunosupresora

Los primeros experimentos, realizados en 1977 usando ratas como modelo animal, demostraron que previene inmunopatías y la formación de IgE. Años más tarde, entre 1990 y los 2000, se comenzó a usar en modelos animales de trasplantes y se observó que inhibe la respuesta inmune y que reduce el rechazo. A partir de ahí, se comenzó a usar en trasplantes en clínica y demostró ser más eficaz y menos tóxica que la ciclosporina. También se vio que era eficaz contra el rechazo crónico y que en casos de trasplantes de corazón reduce el riesgo de muerte. Además, muestra sinergia con otros fármacos inmunosupresores. Por ello, entre los años 1999 y 2000, se consiguieron las primeras patentes en USA y en Europa respectivamente (High *et al*, 1997; Martel *et al*, 1977; Tsai *et al*, 2003).

4.9.3 Actividad antitumoral

La Rapamicina también demostró eficacia antitumoral en modelos animales de cáncer de colon y cerebro (Eng *et al*, 1984). Además, al igual que sucede cuando se usa como fármaco inmunosupresor, presenta sinergia con otros antitumorales: Junto con cisplatino reduce el crecimiento en líneas tumorales Ishikawa, ECC-1 Y HELA (Hang *et al*, 2012; Bae-Jump *et al*, 2009). Junto con plactaxel, inhibe la proliferación y aumenta la apoptosis en las líneas celulares Ishikawa y ECC-1 (Shafer *et al*, 2010). Junto con ácido tetra-O-metil nordihidroguaretico, aumenta en un 100% la esperanza de vida en ratones con tumores implantados. (Kimura & Huang, 2016).

4.9.4 Efecto de la Rapamicina en la esperanza de vida

También se ha observado que la Rapamicina puede aumentar la esperanza de vida en modelos animales. Este efecto se comenzó a investigar en los años 2000, cuando se observó que mutaciones en TOR producían un aumento de la supervivencia en *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila sp.* (Kaeberlein *et al*, 2005; Kapahi *et al*, 2004). En 2009, se demostró que en ratones alimentados con Rapamicina la esperanza de vida de los animales, tanto machos como hembras, aumenta. Estos efectos se observaron en animales de edad avanzada (aproximadamente 600 días) y otros grupos observaron efectos similares en ratones más jóvenes (aproximadamente 270 días) (Harrison *et al*, 2009).

4.10 Limitaciones clínicas de la Rapamicina y los rapálogos

Una de las limitaciones fundamentales de la Rapamicina es su baja solubilidad en agua, lo que dificulta bastante su administración a pacientes. Con intención de mejorar esa limitación surgieron derivados de la Rapamicina, conocidos como Rapálogos mediante CRISPR y el uso de enzimas PKS que usan los microorganismos para sintetizar Rapamicina. Ejemplos de estas sustancias son Temsirolimus que se administra vía intravenosa o Everolimus que se administra por vía oral (Yuan *et al*, 2009). El uso de la Rapamicina y sus rapálogos ha mostrado tener efectos adversos, como el riesgo de infecciones o incluso desarrollo de cáncer debido a su actividad inmunosupresora. Además, estudios con modelos animales muestran que también puede producir desordenes metabólicos debido a la inhibición de mTORC2 que produce la exposición prolongada a la Rapamicina. Por ello estrategias en las que se inhibe específicamente a mTORC1 son una interesante alternativa al uso de Rapamicina y sus derivados (Laming, 2021).

HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS

A día de hoy, hay pocos trabajos en los que se haya visto una relación directa entre mTOR y los canales iónicos. Sin embargo, sabemos que diversas hormonas como la insulina o la leptina, y factores tróficos como el IGF-1 o la noradrenalina son activadores de mTOR (Clauson *et al*, 1998; Ezzat *et al*, 2008; Ti *et al*, 2011). Por otro lado, también sabemos que estas mismas hormonas y factores tróficos son necesarios para la correcta expresión de canales de potasio cardiacos (Díaz-Asensio *et al*, 2008; Gallego *et al*, *Physiol Res* 2003; Gallego *et al*, 2000; Gómez-Hurtado *et al*, 2014). Por lo tanto, es posible que mTOR sea el mecanismo común encargado de regular la expresión de canales iónicos cardiacos, entre los que uno de los más importantes desde el punto de vista clínico es el canal hERG.

Así, teniendo en cuenta la posible relación entre la vía mTOR y la regulación de canales iónicos y que algunos de los factores tróficos que regulan a mTOR son los mismo que necesita hERG para su correcto funcionamiento, nuestra hipótesis principal es que mTOR regula al canal hERG.

Por todo ello, los objetivos que planteamos en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Determinar si la inhibición de mTOR mediante su inhibidor clásico Rapamicina, afecta a la corriente hERG.
2. En caso de producirse un efecto sobre el canal, analizar si es realmente debido a la inhibición de mTOR o si se trata de un efecto de la propia Rapamicina
3. Estudiar si la regulación por mTOR del canal hERG implica cambios en la transcripción, en la traducción o en el tráfico a la membrana plasmática.
4. Esclarecer cuál de los dos complejos mTOR, mTORC1 o mTORC2, es el responsable de regular al canal hERG.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Equipamiento

1.1 Equipamiento general.

- Micropipetas de precisión de volumen variable: 0,5-10, 10-100, 20-200 y 100-1000 μ l. Nichipet, Biopette
- Balanza de precisión AB204. Mettler Toledo
- Pipetas de volumen variable: 1, 2, 5, 10 y 20 ml. Silber Brand
- Dispensador automático 0,5-10 ml Mulipette plus. Eppendorf
- pHmetro BasicC. Crison
- Vortex Reax Top Heidolph

1.2 Mantenimiento y transfección de los cultivos celulares.

Para el mantenimiento y manipulación de las células se han utilizado los siguientes materiales y aparatos:

- Frascos Corning, 25 cm²
- Placas de cultivo 100 x 20 mm. Falcon
- Placas de cultivo Sarstedt, 25x15 mm
- QIAprep Spin Miniprep Kit. Qiagen
- Baño termostatzado Nahita
- Incubador de CO₂. Sanyo
- Microscopio invertido de epifluorescencia Leica
- Cabina de seguridad biológica. Faster BH2004
- Estufa Selecta ·
- Centrífuga Sprecetafuge 24D Labnet
- Bomba de vacío ·

- Centrífuga refrigerada de alta velocidad 2-16 pk. Sigma

1.3 Registros electrofisiológicos.

Los registros electrofisiológicos se realizaron en un equipo compuesto por los elementos que se detallan a continuación:

- Micromanipulador piezoeléctrico Burleigh PZ-305, con 70 μm de movimiento en cada uno de los tres ejes
- Macromanipulador mecánico de posicionamiento Newport 360-90, con 5 cm de movimiento en cada uno de los tres ejes
- Microscopio invertido de epifluorescencia DMIL con contraste de fases. Leica
- Amplificador de señales/generador de estímulos Axopatch 200B. Axon Instruments Inc
- Interfase analógico/digital DigiData 1440. Axon Instruments Inc
- Estirador de micropipetas PP-830. Narishige
- Sistema de perfusión
- Bomba de vacío
- Mesa antivibratoria TMC
- Software de adquisición Clampex 10.2. Axon Instrument Inc
- Software de análisis Clampfit 10.2. Axon Instrument Inc
- Vidrio de borosilicato 1,10 mm de diámetro interno y de 1,5 mm de diámetro externo. Sutter Instrument

1.4 Detección de proteínas

- Homogeneizador Pestle, Sigma
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad 2-16 pk. Sigma.

- Espectrofotómetro WPA 1101 Biotech Photometer
- Agitador Agimatic N. Selecta
- Agitador ARF. Velp
- Agitador magnético ARE VELP Scientifica
- Fuente de alimentación PowerPac 300. BioRad
- Mini protean Tetra Cell. BioRad
- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. BioRad
- Cubeta de transferencia líquida Mini protean. Biorad
- Plataforma agitadora Duomax 1030. Heidolph
- Sistema de adquisición de imágenes Gelogic 2200. Kodak

2. Disoluciones

Para hacer todas las disoluciones empleadas en la presente tesis doctoral se utilizó agua ultrapura Tipo I desionizada.

2.1 Medio de cultivo para el mantenimiento de células Hek-293 y Hek-hERG

- Dubelcco's modified Eagle's médium (DMEM)
- Suero bovino fetal (FBS) 10%
- Cóctel de penicilina, estreptomina 1%
- Geneticina al 0.8% (0.4mg/ml)

2.2 Medio de cultivo para el mantenimiento de células HL-1.

- Medio Claycomb
- Suero bovino fetal (FBS) 10%

- Cóctel de penicilina, estreptomina 1%
- Noradrenalina y L-glutamina 1%

2.3 Disoluciones para el levantamiento de los cultivos celulares

- Tampón fosfato salino (PBS)
- Tripsina-EDTA 10X

2.4 Disoluciones para la congelación de células HEK-HERG

- DMEM
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 10%

2.5 Disoluciones para la transfección celular

- DMEM
- FBS
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Raptor siRNA (santa cruz)
- Rictor siRNA (santa cruz)

2.6 Disoluciones empleadas en los registros electrofisiológicos.

2.6.1 Solución interna para registrar IhERG

- KCl 125 mM
- MgCl 5 mM
- HEPES-K 10 mM
- EGTA-K 5 mM
- ATP-Na 5 mM

- El pH de esta disolución se ajusta a 7.2 con KOH

2.6.2 Solución externa para registrar I_hERG

- NaCl 136 mM
- KCl 4 mM
- CaCl₂ 1.8 mM
- MgCl₂ 1 mM
- HEPES-Na 10 mM
- Glucosa 10 mM

Aquí serán disueltos algunos de los fármacos problema

2.6.3 Solución interna para registrar I_{Kur}.

- KCl 125 mM
- MgCl 5 mM
- HEPES-K 10 mM
- EGTA-K 5 mM
- ATP-Na 5 mM
- El pH de esta disolución se ajusta a 7.2 con KOH

2.6.4 Solución externa para registrar I_{Kur}

- KCl (4 mM)
- CaCl₂ (0.5 mM)
- MgCl₂ (1 mM)
- CoCl₂ (2 mM)
- HEPES (10 mM)

- TEA-Cl (130 mM)
- Glucosa (11 mM)

Aquí serán introducidos algunos de los fármacos problema

2.7 Disoluciones para la detección de proteínas.

- BCA
- CuSO₄
- BSA 1mg/ml

2.7.1 Tampón de lisis

- Tris HCl 20 mM pH 7.4
- EDTA 1mM
- Inhibidor de proteasas 0.5%

2.7.2 Geles para electroforesis

- H₂O
- Tris HCl 0.5 M pH 6.8 para el concentrador
- Tris HCl 0.5 M pH 8.8 para el separador
- Acril/Bis 30%
- APS 100 mg/ml
- TEMED

2.7.3 Tampón Laemli

- Tris-HCl 60 mM, pH 6.8
- SDS 3%

- Glicerol 10%
- Azul de Bromofenol 0.003%
- b-mercaptoetanol 1%

2.7.4 Tampón electroforesis

- Tris-HCl 50 mM, pH 8.5
- Glicina 384 mM
- SDS 0.1%

2.7.5 Tampón transferencia Tris-HCl 25 mM, pH 8.3

- Glicina 192 mM
- Metanol 20%
- SDS 0.05%

2.7.6 TBS (Tris-Buffer-Saline)

- Tris-HCl 50 mM, pH 7.5
- NaCl 150 mM

2.7.7 Solución de lavado TTBS (TBS-Tween)

- Tris-HCl 50 mM, pH 7.5
- NaCl 150 mM
- Tween-20 0.05 mM

2.7.8 Solución de bloqueo.

- Leche desnatada en polvo 5% en TBS

2.7.9 Reactivos de revelado.

- Reactivos de quimioluminiscencia Super Signal West pico. Thermo.

3. Small interfering RNA (siRNA).

- *Raptor siRNA (h) sc-44069*
- *Rictor siRNA (h) sc-61478*

4. Anticuerpos.

4.1 Anticuerpos primarios.

Los anticuerpos primarios utilizados han sido los siguientes:

- anti-hERG Santa Cruz Biotechnology 1/300, goat
- anti-tubulina Santa Cruz Biotechnology 1/1000, mouse
- anti-Raptor Santa Cruz Biotechnology 1/200, mouse
- anti-Rictor Santa Cruz Biotechnology 1/200, mouse

4.2 Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes:

- anti-mouse Sigma-Aldrich 1/2000
- anti-goat Santa Cruz Biotechnology 1/2000

5. Cultivos celulares

Para llevar a cabo este proyecto, se ha usado la línea celular HEK-293 que expresa de manera estable el canal hERG. Esta línea, a la que llamaremos HEK-hERG, es ampliamente utilizada en el estudio de la expresión heteróloga de canales iónicos ya que prácticamente no expresan de forma endógena dichos

canales. Para mantener el cultivo estable, se usa geneticina como seleccionador de células que expresan el plásmido. (Zhou *et al*, 1998)

También se ha usado la línea celular HL-1, células de aurícula de ratón a partir de cardiomiocitos tumorales de ratones AT-1, caracterizadas por William C. Claycomb. Estas células han sido utilizadas para el registro de la corriente de salida de potasio ultra-rápida o I_{Kur} , principal corriente repolarizante en aurículas. El canal responsable de la I_{Kur} es el Kv1.5 (Claycomb *et al*, 1998).

5.1 Mantenimiento de los cultivos

En primer lugar, todas las soluciones se deben precalentar a 37° C antes de usarlas con el cultivo celular. Este procedimiento es igual para todas las líneas usadas. El cultivo celular se mantiene en el incubador a 37°C y con un 5% de CO₂.

Para el mantenimiento del cultivo de la línea HEK-hERG, se ha usado un medio de cultivo DMEM que hay que complementar con FBS al 10%, penicilina y estreptomycinina al 1% y geneticina al 0.8%. Para las HL-1 el medio utilizado es el medio Claycomb el cual también hay complementar con FBS, penicilina y estreptomycinina. Además, al medio Claycomb se le debe añadir L-glutamina y noradrenalina al 1%.

5.2 Propagación del cultivo

Cuando el cultivo alcanza una confluencia del 70-80%, es decir, cuando se alcanza un crecimiento suficiente para cubrir la mayor parte del frasco (en este caso un T25), se separa el cultivo en distintas placas o frascos para evitar el sobrecrecimiento. Para ello, se desecha el medio, se lava dos veces con PBS y se añade tripsina-EDTA (0.1 ml de tripsina 10x en 1 ml de PBS). La tripsina es una enzima que hidroliza enlaces entre células y de las células con la matriz, en este caso, el fondo del frasco. Se deja el frasco con tripsina en el incubador y esperamos durante 2-5 minutos. Después de ese tiempo, se separa en una dilución 1:25 a distintos frascos. La frecuencia de los pases dependerá de la línea celular y su velocidad de crecimiento.

5.3 Criopreservación de los cultivos

Para la criopreservación de las células usamos medio DMEM sin complementar y añadimos DMSO al 10% y FBS al 20% para las HEK-hERG y FBS con DMSO al 5% para las HL1. El DMSO es un disolvente orgánico que permite la congelación de las células sin que estas sean dañadas. El proceso de criopreservación es peligroso para las células debido a la formación de cristales de hielo que rompen la membrana. Además, cuando se descongelan, la descongelación de las sales sucede antes que la del agua, por lo que el medio intracelular es durante un tiempo hiperosmótico, y el choque osmótico también rompe las membranas. Habitualmente el proceso de congelación se hace con los primeros pases para que el cultivo no acumule demasiados pases y las células no pierdan sus propiedades.

Para criopreservar un cultivo, se usa el mismo procedimiento que se usa para los pases usando tripsina. Una vez las células se han despegado se recogen y contabilizan mediante una cámara de Neubauer, lo cual nos permite congelar la cantidad adecuada de células para la criopreservación, aproximadamente 1 millón. Una vez recogida esa cantidad de células, se introducen en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifuga a 500 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se desecha el sobrenadante, se resuspende el pellet en 1 ml de medio de congelación y se introduce en un vial de congelación. Finalmente, el vial se guarda en una caja aislante para reducir la velocidad de congelación durante 12-24h a -80°C y pasado ese tiempo, en nitrógeno líquido a -180°C.

Para recuperar un cultivo que ha sido congelado, la descongelación debe ser rápida para reducir el choque osmótico y evitar que las células se rompan. Para ello, las células se descongelan a 37°C durante 2 minutos y se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se desecha el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de medio de cultivo complementado. Finalmente se añade el ml a un frasco T25 y se le añaden otros 4 ml de medio.

6. Tratamientos con Rapamicina, Torina y JRAB2011

Para las incubaciones con fármacos sembramos las células en placas de 12 pocillos. Es un tamaño de placa que permite utilizar un menor volumen de fármaco y resulta cómodo para lisar las células. Se siembran aproximadamente 500×10^3 células en 2 ml del medio correspondiente. A continuación, añadimos el fármaco a la concentración deseada e incubamos por un tiempo variable en función de las características del experimento. Para el tratamiento con Rapamicina se prepara una disolución madre de 10 mM en la que se disuelven 5 gramos de en 0.55 ml de DMSO. Las concentraciones usadas han sido: 0.05, 0.5 y 5 μ M. Para el tratamiento con Torina-1 se prepara una disolución madre de 10 mM en la que se disuelven 10 miligramos en 6 ml de DMSO. La concentración usada ha sido de 3 μ M. Finalmente, para el tratamiento con JRAB2011 se prepara una disolución madre de 10 mM en la que se disuelven 5 mg gramos en 1.25 ml de DMSO. La concentración usada ha sido de 3 μ M.

7. Silenciamientos mediante transfección de siRNA

De entre los sistemas de regulación de la expresión proteica de las células destaca el mecanismo intracelular conocido como RNA de interferencia (RNAi). Este mecanismo se produce de manera natural en las células mediante pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNA (miRNA). Los miRNA son cadenas de RNA no codificante de una longitud aproximada de entre 21-25 nucleótidos que se unen a la molécula de RNA mensajero (mRNA) de la proteína en cuestión con complementariedad parcial y causa la degradación del mRNA inhibiendo la síntesis de la proteína. Este mecanismo se conoce como silenciamiento de un gen y afecta a un gran número de proteínas como, por ejemplo, el canal iónico hERG (Lian *et al*, 2016).

Aprovechando esta misma maquinaria celular, se pueden sintetizar moléculas de RNA para silenciar cualquier gen de interés. Entre otros, una de esas moléculas sintéticas de mRNA es el *short interfering RNA* o siRNA, una molécula de doble cadena de RNA no codificante que una vez dentro de la célula se une al mRNA de la proteína de interés inhibiendo así su síntesis (Rao *et al*, 2009). Una vez en el citoplasma de la célula, el siRNA puede seguir varios

caminos. Por un lado, el siRNA bicatenario es cortado en varios siRNA más pequeños por la enzima DICER. Esos pedazos de siRNA se unen al complejo proteico RISC y la doble cadena se separa. Por otro lado, si el siRNA introducido es lo suficientemente pequeño, se une directamente a RISC. Con el siRNA unido al complejo RISC y separado, el complejo localiza el mRNA y se une a él mediante la cadena antisense del siRNA. Finalmente, el complejo RISC se encarga de cortar el mRNA el cual será secuestrado en estructuras denominadas cuerpos P. El siRNA también puede usarse contra RNA nucleolar (Figura 29) (Rao *et al*, 2009; Rahul *et al*, 2018).

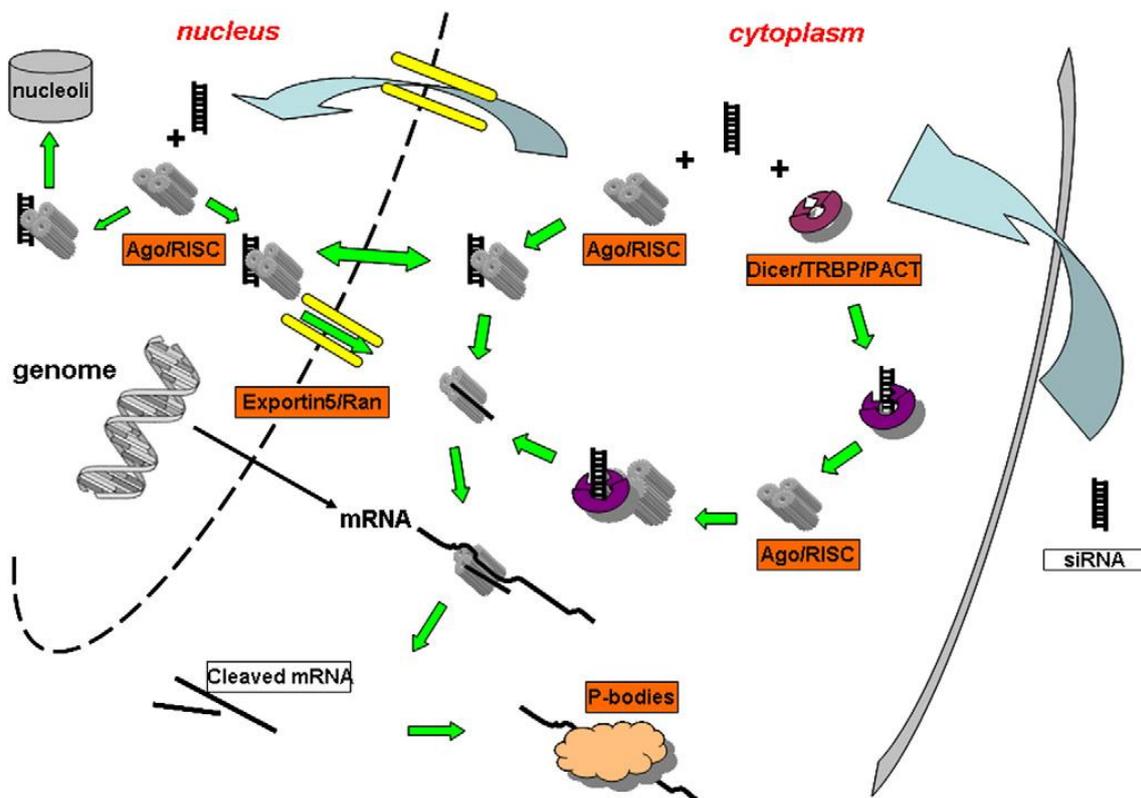


Figura 29. Mecanismo de acción del siRNA dentro de la célula. El siRNA entra dentro de la célula donde los complejos DICER y RISC se encargan de cortarlo y transportarlo al mRNA diana (Rao *et al*, 2009).

Con el objetivo de esclarecer cuál de los dos complejos de mTOR es el responsable del efecto observado, se han llevado a cabo experimentos de silenciamiento mediante siRNA de las dos proteínas clave de cada complejo:

Raptor para mTORC1 y Rictor para mTORC2. Para realizar la transfección es recomendable que la confluencia del cultivo celular sea entorno al 70%. Esto se debe a que la lipofectamina es tóxica para las células y puede matar un gran número de células en el proceso.

El primer paso para el silenciamiento consiste en la preparación del RNA para poder usarlo en placas de cultivo. Para ello, se disuelven el contenido de cada vial, 3.3 moles de RNA, en 300 μ l de agua destilada libre de RNAsas. Esto último es importante debido a la abundancia de RNAsas y la poca estabilidad del RNA. De ese modo se obtiene una disolución de 10 μ M de la que se usan 20 μ l (correspondiente a 2 μ g).

La preparación de la solución de transfección consiste en mezclar siRNA y lipofectamina. La lipofectamina es una sustancia lipídica que envuelve el RNA en micelas permitiendo así su entrada en la célula. Para preparar la solución, se mezclan 20 μ l del siRNA diluidos en 80 μ l de medio de transfección (DMEM sin complementar). Por otro lado, se mezclan 3 μ l de lipofectamina (3 μ l por cada gramo de siRNA) con 97 μ l de medio de transfección. Después se mezclan ambas soluciones y se deja la mezcla reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes añadirlo a las células. Transcurridos 30 minutos de reacción, se añade la mezcla mencionada anteriormente al cultivo, se le añaden además 800 μ l de medio de transfección logrando así un volumen total de 1 ml y se mantienen en el incubador durante 5 horas para que el siRNA entre en las células. Transcurrido el tiempo de incubación, se añade 1 ml de DMEM con un 20% de FBS, lo que inhibe la toxicidad de la lipofectamina y permite al cultivo comenzar a crecer de nuevo. Finalmente, las células se recogen 24, 48 y 72 horas después para su posterior procesamiento.

8. Lisado de células y extracción y detección de proteínas.

Para analizar los efectos de los tratamientos con fármacos y silenciadores, es necesario romper las células y extraer las proteínas. Para ello se realizan dos lavados con 1 ml PBS, se añade otro ml de PBS y con la ayuda de un scrapper

o rascador, se rasca el fondo de la placa con suavidad hasta despegar las células. Después, se recogen las células, se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante. Al pellet se le añaden 100 µl de tampón de lisis hiposmótico y se deja reposar durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se homogeneiza mecánicamente con ayuda del homogeneizador pestle dando 5 pulsos de 10 segundos con 3 segundos de descanso entre cada pulso. Si la cuantificación de la cantidad total de proteína no se va a realizar inmediatamente, la muestra se congela para su posterior procesamiento.

8.1 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteína total en una muestra el método de elección es la cuantificación mediante Ácido Bicínico o BCA. El BCA es un reactivo cromogénico que cuando se une a Cu^+ adquiere un color púrpura. Para la cuantificación se prepara una mezcla de BCA con CuSO_4 y se añade a la muestra. En presencia de residuos de cistina, cisteína, triptófano o tirosina de las proteínas el Cu^{2+} se reduce a Cu^+ y la concentración de proteínas puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución de verde a púrpura. La cuantificación, se mide mediante un espectrofotómetro. Este aparato aplica un haz de luz con una longitud de onda de 562 nm sobre la muestra y es absorbido por la misma. Lo que mide el aparato es la luz que pasa al otro lado de la muestra, lo que se denomina absorbancia. La absorbancia que se mide es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. Para estimar la cantidad de proteína de la muestra primero se hace una recta patrón con distintas concentraciones de BSA (Albúmina Sérica Bovina).

8.2 Detección de proteínas mediante electroforesis y Western Blot

La electroforesis en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) consiste en la migración de las proteínas por un gel desnaturizante de acrilamida en el que se genera un campo eléctrico. La acrilamida forma una matriz porosa por la que las proteínas avanzan hacia el polo positivo en función de su tamaño: cuanto más pequeña sea la proteína más fácil y más lejos migrará. La concentración de

acrilamida en el gel puede variar para conseguir matrices más o menos compactas, en este proyecto se usan geles al 8%. Además, para permitir el movimiento de las proteínas estas son previamente desnaturalizadas mediante calor (5 minutos a 95-100°C) y SDS.

Mediante la técnica de Western Blot, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante capilaridad y la aplicación de un campo eléctrico. Una vez transferidas, mediante técnicas de inmunodetección, se pueden identificar las proteínas de interés. Para ello, la membrana se bloquea mediante leche.

Para la inmunodetección se utiliza un anticuerpo primario específico que identifica la proteína de interés. Después, para localizar el complejo antígeno-anticuerpo primario, se utiliza un anticuerpo secundario contra la especie en la que se ha obtenido el primario. Estos anticuerpos secundarios llevan unidos una gran diversidad de moléculas, como enzimas, que mediante distintas reacciones producen una imagen detectable. En este caso, la enzima de los anticuerpos secundarios es una peroxidasa. Para la detección se usa un sistema de quimioluminiscencia, que hace que la energía producida durante una reacción química sea emitida en forma de luz. El equipo para realizar la técnica se puede observar en la (Figura 30)

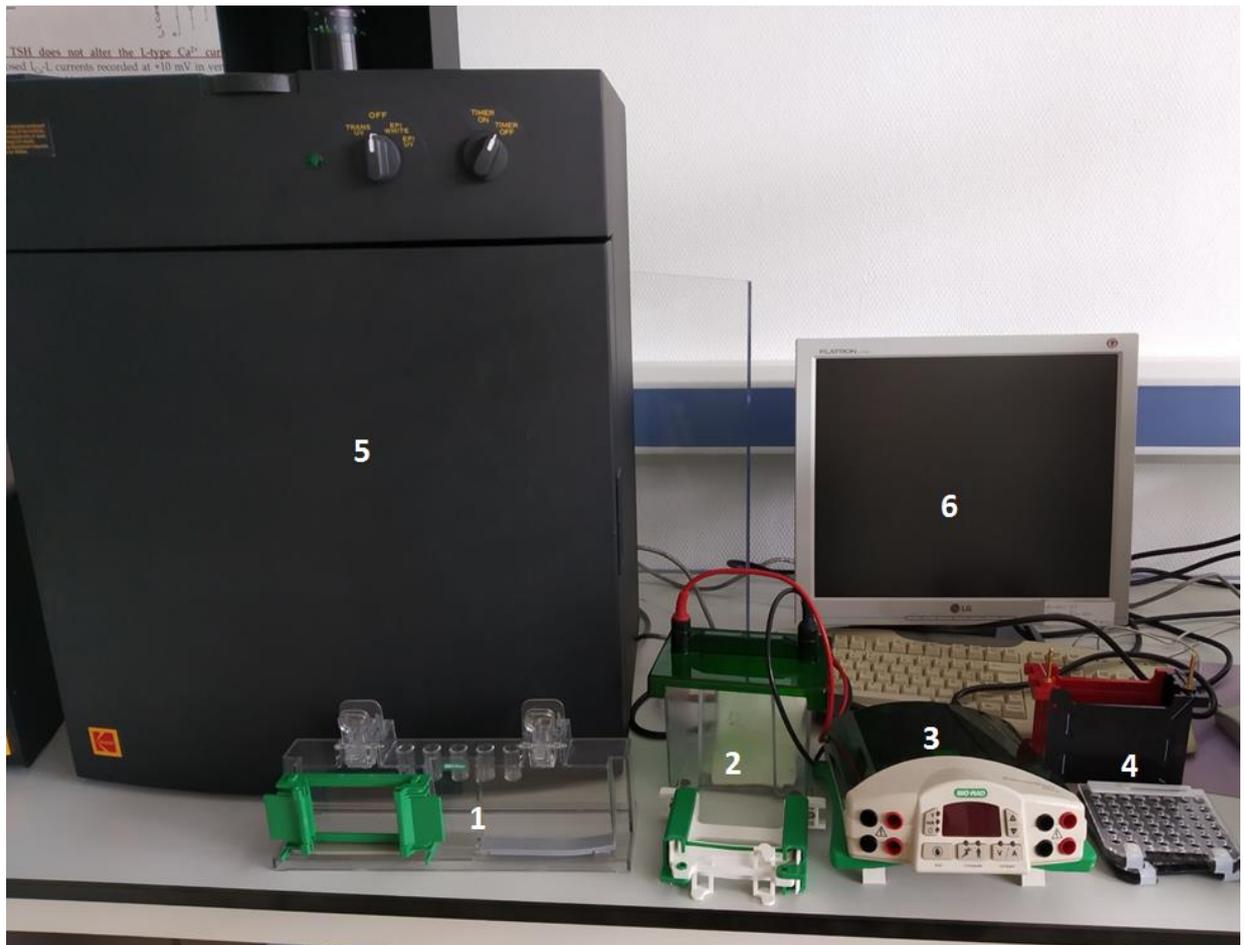


Figura 30. Equipamiento para la técnica de Western Blot. 1) Soporte para cristales, 2) cubeta y soporte para el gel con electrodos, 3) fuente de alimentación, 4) Sandwich y soporte de los mismos para transferencia, 5) Cámara de revelado 6) ordenador al que se conecta la cámara de revelado.

8.3. Desnaturalización de la muestra y parámetros de la electroforesis y transferencia

Para desnaturalizar la muestra se necesita el tampón de muestra o laemli, el cual contiene SDS para la desnaturalización química, y una fuente de calor que permita la desnaturalización física. La cantidad de tampón de muestra que se añade dependerá del volumen que le corresponda a la cantidad de proteína que se cargue en el gel. Nosotros cargamos una cantidad de proteína de 40 μ g.

Una vez desnaturalizada la muestra, se carga en el gel previamente preparado y se comienza la electroforesis. Primero, se aplica un voltaje de 100

mV para concentrar la muestra y una vez llega al gel separador se aumenta el voltaje a 120 mV para que termine de migrar por el gel.

Cuando la electroforesis termina, se realiza la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa previamente activada durante 5 minutos en agua destilada. Para la transferencia se aplica un amperaje de 300 mA durante 90 minutos.

8.4 Tinción con Rojo Ponceau

Con la transferencia finalizada, se comprueba si la transferencia ha ido bien mediante la tinción de la membrana con el compuesto Rojo Ponceau. Este compuesto es un colorante que se une de manera indiscriminada a todas las proteínas. Para la tinción se baña la membrana en Rojo Ponceau durante 5 minutos y pasado el tiempo se va destiñendo con agua destilada hasta que se puedan observar las bandas correspondientes a las proteínas que han migrado (Figura 31).



Figura 31. Incubación de la membrana con Rojo ponceau. Membrana de nitrocelulosa tratada con Rojo ponceau.

8.5 Bloqueo e incubación con anticuerpos

El bloqueo tiene la función de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos saturando las membranas con proteínas de gran tamaño como, por ejemplo, la caseína de la leche. Estas proteínas se unen a las zonas de la membrana en las que no hay proteína cargada, lo cual evita que luego el anticuerpo se una a la membrana de manera no específica. La solución de bloqueo se añade a la membrana y se incuba durante al menos 1h. Esta misma solución de leche será utilizada posteriormente para preparar la solución de los anticuerpos.

La dilución del anticuerpo dependerá tanto de lo eficaz que sea el anticuerpo como de la cantidad de proteína de interés detectable que haya en la muestra. La incubación con el anticuerpo primario se hace a 4°C durante una noche entera (overnight). Finalizada la incubación, se lava la membrana 3 veces durante 10 minutos con una solución de TBS con detergente tween20 al 0.5% y se incuba con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 2h. Después de esas 2 horas la membrana se lava otras 3 veces.

8.6 Revelado

Los anticuerpos secundarios utilizados están conjugados a la enzima peroxidasa de rabano (HRP, horseradish Peroxidase) que en presencia de un sustrato, en este caso H_2O_2 , produce luminiscencia detectable por equipos de imagen. A la membrana se le añaden 2ml de sustrato Super Signal West Pico Plus (Thermo) durante 5 minutos y se tapa para que no les de la luz. Pasado el tiempo, se dejan exponer durante un tiempo variable, dependiendo del anticuerpo, en el equipo de adquisición de imágenes digital Kodak Gel logic 2200.

8.7 Análisis de imagen

El análisis de imagen permite medir de forma numérica la diferencia de intensidad entre bandas, de este modo, siempre que se tenga un buen control de carga, se pueden ver diferencias entre grupos. Mediante el programa Image J se mide la intensidad de cada banda y se compara entre las distintas muestras (Figura 32).



Figura 32. Análisis del revelado con Image J. Imagen de revelado y panel de herramientas abiertos desde la aplicación Imaje J

Se mide la intensidad de la banda de la proteína de interés y la del control de carga, en nuestro caso, la tubulina. Después se normaliza cada una de ellas respecto a la intensidad de fondo restándole a cada banda una franja en la que no haya tinción. Finalmente, se divide la intensidad de cada banda de la proteína de interés entre la de la tubulina.

9. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

La RT-qPCR es una técnica que permite cuantificar la cantidad de mRNA de un gen. En este caso testar si la Rapamicina afecta al canal hERG a nivel de mRNA. Para ello además del gen que codifica el canal hERG (KCNH2), también se usan controles endogenos o “*housekeeping*”. Estos genes son aquellos cuya expresión no varía y se usan como normalizadores, como son los genes TUBA1, GAPDH, UBC y TOP1 que se han elegido.

Este tipo de PCR consiste en retrotranscribir el mRNA a cDNA y posteriormente realizar la PCR. Esta técnica permite medir los ciclos de replicación del DNA mediante sondas fluorescentes como el SYBR green. La fluorescencia es detectada por un sistema óptico.

El método de cuantificación, se trata de una cuantificación relativa en el que se compara el valor umbral de ciclos o Cq del gen KCNH2 en muestras control y tratadas con Rapamicina. El valor Cq determina el número de ciclos que necesita la muestra para alcanzar la fase exponencial de replicación. Este valor será menor cuanto mayor sea la concentración original de mRNA de la muestra. Para normalizar y poder comparar los Cq se usa la siguiente transformación, la cual nos devuelve el dato del Cq normalizado respecto al control endógeno:

$$2^{\Delta Cq}$$

Donde ΔCq es: (Cq del gen de interés – Cq gen normalizador)

Las células HEK-hERG se trataron con Rapamicina 0.05 μ M y 5 μ M durante 24h, se recogieron usando una solución comercial “TRI-reagent” de Applied Biosystems y se enviaron al servicio SGIKER de la UPV-EHU para la extracción del mRNA y posterior RT-qPCR.

10. Técnica de pinzamiento de membrana o Patch-Clamp

El primer registro de actividad eléctrica cardíaca, en concreto de un potencial de acción, se realizó en 1951 en preparaciones multicelulares (Draper and Weidmann, 1951). Hodgkin y Huxley desarrollaron la técnica de fijación de voltaje en 1952 (Hodgkin *et al*, 1952; Hodgkin & Huxley, 1952), técnica que les valió un el premio Nobel de fisiología-medicina en 1963. Posteriormente, la técnica denominada “pinzamiento de membrana” permitió fijar el voltaje de toda la membrana de una célula aislada, o de solo una pequeña porción de la misma. Esta técnica desarrollada por Neher y Sakman (Neher and Sakman, 1976; Neher

et al, 1978; Hamil *et al*, 1981), les valió a su vez el premio Nobel en la misma área en 1991.

Esta técnica permite estudiar el comportamiento de un canal en diferentes condiciones mediante la aplicación de voltaje. Además de ello, mediante el registro de las corrientes estimulando a la célula con distintos protocolos, es posible también analizar las propiedades biofísicas del canal. En la figura 33 se muestra el equipo que consiste en un conjunto de aparatos.



Figura 33. Elementos que forman el aparato de Patch Clamp: Salida de aire comprimido (1), estirador de pipetas (2), microscopio invertido (3) dentro de una mesa de antivibración (6), macromanipulador (4), micromanipulador (5), batería del microscopio (7), fuente del micromanipulador (8), interfase (9), amplificador (10), odenador (11).

Para realizar los registros, se puede usar la propia placa de petri. En este caso, se retira el medio de cultivo y se cambia por 2 ml de solución externa. Las células se dejan reposar durante 10 minutos. Finalmente, se coloca la placa en el microscopio y se introduce el microelectrodo en la placa para empezar a registrar (Figura 34 izquierda). Otra opción es trasladar a las células a la cámara de perfusión 0.5 ml de volumen montada en el microscopio (Figura 34 derecha)

lo cual permite tener la solución externa en perfusión y cambiar de tipo de solución externa.

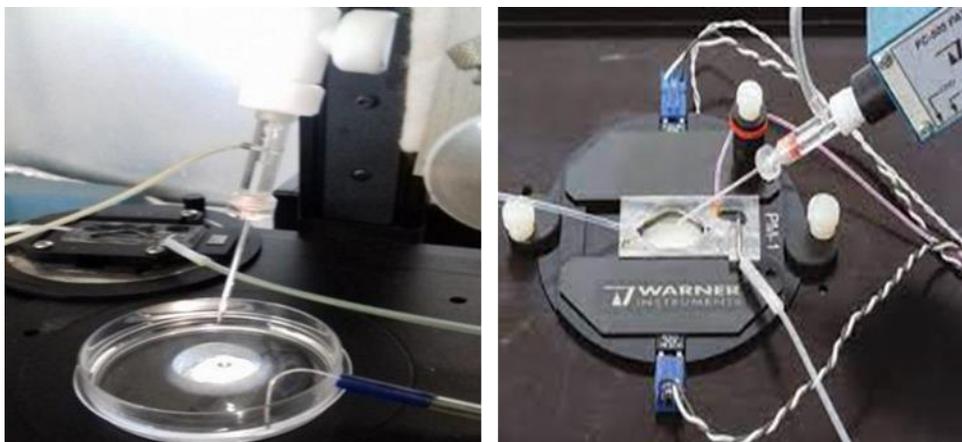


Figura 34. Colocación de las células para Patch-Clamp. Placa de Petri colocada en el microscopio para registrar (izquierda) y cámara de perfusión (derecha)

Para los experimentos con incubaciones agudas los registros se realizan en perfusión. Las células se añaden en la cámara y se dejan posar durante 10-15 minutos para se adhieran al fondo. Pasado ese tiempo, se abre la perfusión de la cámara por la que se hace pasar una disolución externa en la que se añade DMSO, es decir, en condiciones control. Se deja pasar la perfusión durante aproximadamente 5 minutos más y luego se comienzan los registros. Cuando se consigue pinchar la célula, se pueden hacer los registros en esas mismas condiciones para registrar control o se puede cambiar a externa con el fármaco que se vaya a testar.

Para registrar las corrientes se usan micropipetas de borosilicato de aproximadamente 2,5 micras diámetro de punta que llevan dentro uno de los microelectrodos. El otro electrodo se introduce dentro de la solución fisiológica (solución externa) en el que se depositen las células. Cuando la micropipeta que contiene solución interna se pone en contacto con la célula, esta se queda dentro del campo eléctrico producido entre los dos electrodos. Mediante la pipeta se mantiene fijado el potencial de la membrana inyectando la corriente necesaria para, posteriormente, aplicar diferentes estímulos y registrar las corrientes resultantes.

El estirador de pipetas fabrica micropipetas a partir de capilares de borosilicato de 1,5 mm de diámetro mediante pulsos de temperatura. Estos pulsos se realizan mediante una resistencia dentro de la cual se coloca capilar. Primero, el estirador da un pulso de calor intenso para estirar el capilar por la mitad, reduciendo a la vez su diámetro. El segundo pulso es de menor temperatura para romper el capilar de manera que se obtienen dos micropipetas con una punta redondeada (Figura 35). La pipeta obtenida se llena de solución interna mediante una jeringuilla con cuidado para que no queden burbujas, ya que estas no permiten la conducción eléctrica.

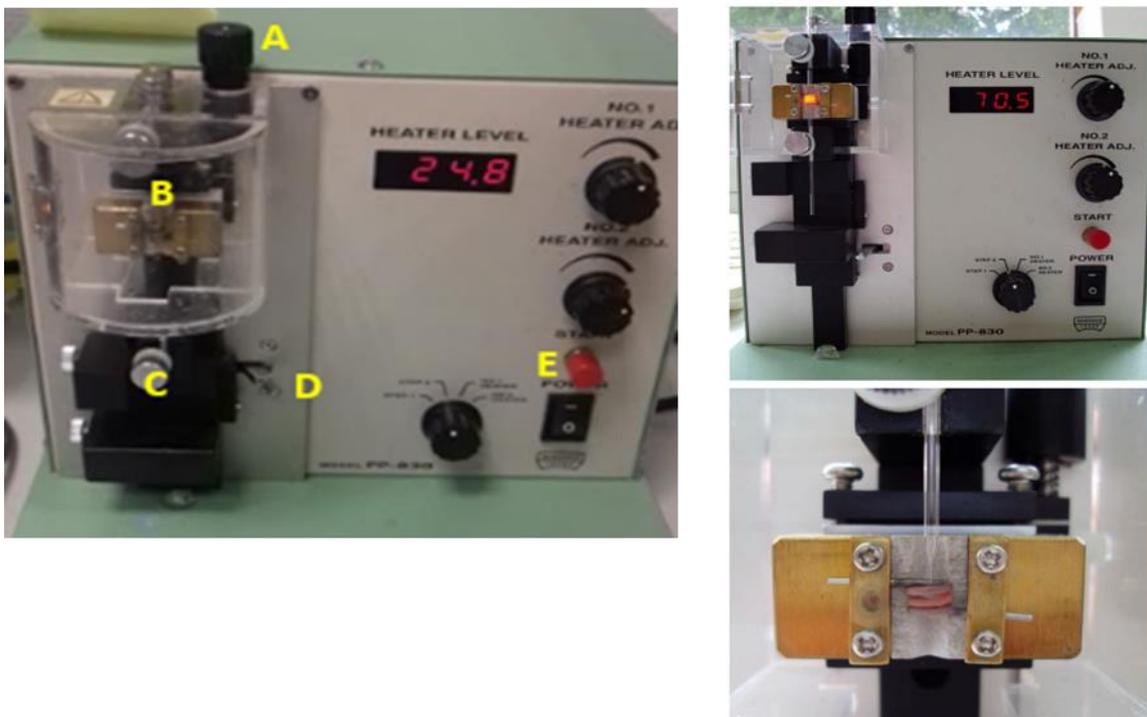


Figura 35. Estirador de pipetas. A la izquierda las distintas partes del estirador, a la derecha, como queda el capilar una vez colocado en el estirador. La pipeta se rompe a la mitad y cae. Tanto el estiramiento como la caída sucede por la fuerza que ejercen los pesos (Las piezas negras bajo la ruleta C)

Con la pipeta en el baño, el amplificador hace pasar a través de ella pulsos de -10 mV a una frecuencia de 10 Hz desde un potencial de 0 a -10 mV. Estos pulsos se registran en la pantalla como una deflexión en corriente eléctrica. Con el dato de amplitud de la corriente y la diferencia de potencial aplicada (-10 mV) se calcula la resistencia de la pipeta mediante la Ley de Ohm:

$$R = V/I$$

Siendo R resistencia, V voltaje e I corriente

La resistencia de la pipeta debe estar entre 1 y 3 MΩ. Las pipetas que se salgan de ese rango son desechadas ya que dificulta el hacer los registros (Figura 36).

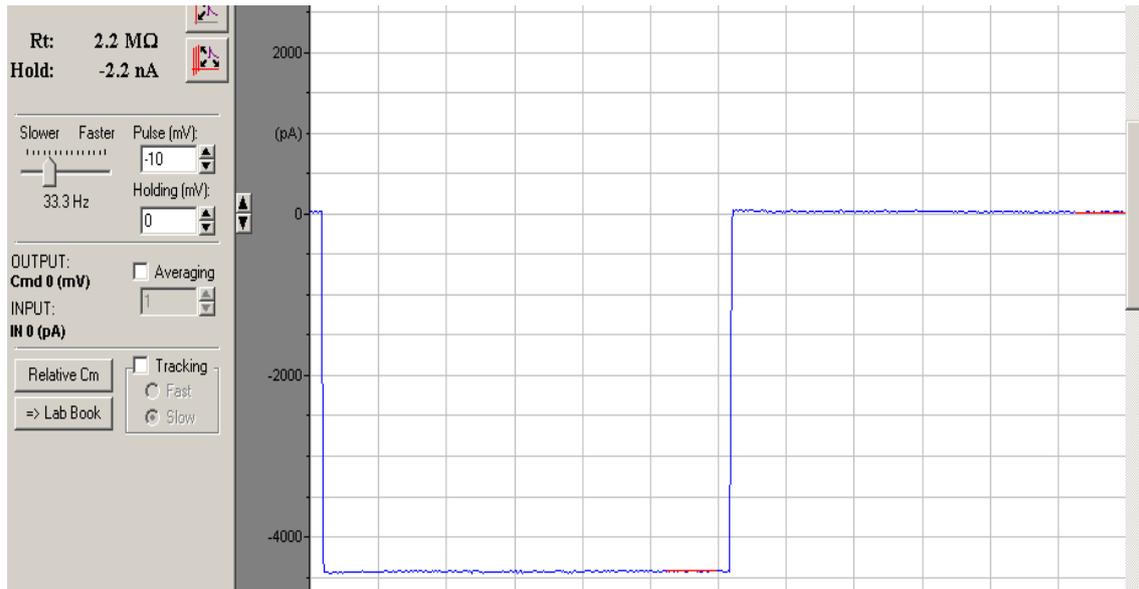


Figura 36. Display de registro en Clampex. Registro de la corriente (pA) y dato de resistencia (MΩ) que calcula el programa clampex cuando se introduce la pipeta en la solución externa. La corriente es la que se registra cuando se le aplica una diferencia de voltaje de -10 mV.

Mediante el micromanipulador se acerca la pipeta a la célula a registrar hasta hacer contacto con la membrana. En ese momento se ejerce presión negativa (succión) para que el pedazo de membrana se invagine hacia dentro de la pipeta, formando un sello de alta resistencia de orden de gigaΩ llamado "gigasello". A continuación, aplicamos una diferencia de voltaje de -10 mV, pero de -60 a -50 mV. Estos voltajes resultan menos agresivos para la célula y además no activan corrientes.

Este aumento de la resistencia se debe a que el contacto con la célula tapona la punta de la pipeta y dificulta el paso de corriente, es decir, la resistencia será cada vez mayor y el paso de corriente entre los dos electrodos será cada vez menor. Traducido a la pantalla del ordenador, cuanto mayor sea la

resistencia menor será la deflexión hasta llegar al punto de igualar la línea isoelectrica. A esta situación se la conoce como “parche sobre la célula” u “on-cell patch”.

A partir de la configuración “on cell” se pueden usar 2 configuraciones distintas. La configuración “parche escindido” que consiste en separar el parche del resto de la célula y la configuración “célula entera” o “whole-cell” que consiste en aplicar una ligera succión rompiendo el parche de membrana comprendido en la punta de la pipeta (Figura 37). Esta última ha sido la configuración usada para este proyecto de tesis doctoral por ser el más adecuado para registrar corrientes de potasio.

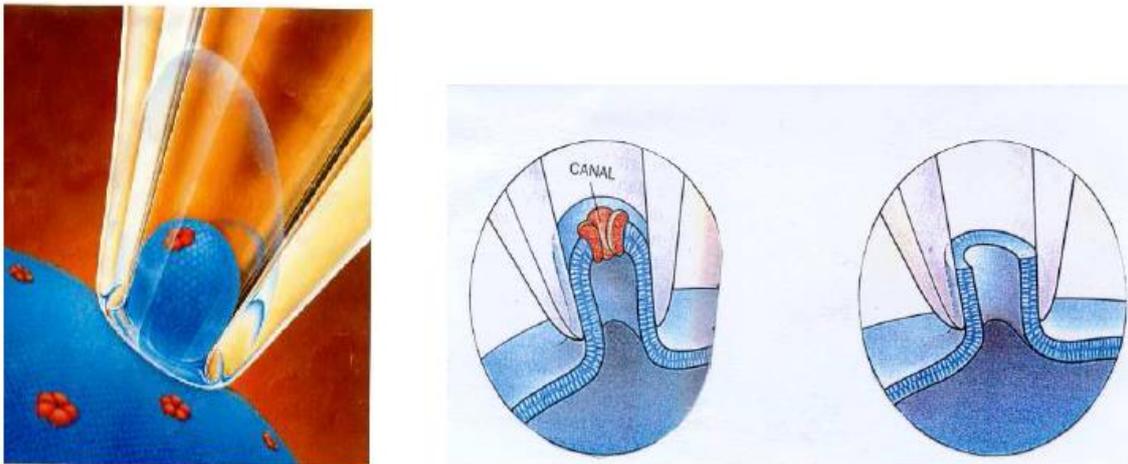


Figura 37. Formación del parche de membrana con la configuración “whole cell”. Se muestra la conformación en la que un pedazo de membrana se introduce en la pipeta para posteriormente romperse y permitir el paso de corriente.

Con el parche roto se produce una diálisis entre la solución interna y el medio intracelular permitiendo su modificación a conveniencia y registrar las corrientes de los canales presentes en la célula. La ruptura del parche produce la aparición de una nueva corriente que aparece de manera instantánea y que desaparece rápidamente. Esa corriente se denomina corriente capacitiva y es la corriente necesaria para cargar -10 mV (el voltaje aplicado) la capacidad de la

membrana de la célula en cuestión. Para obtener capacidad hay que usar la siguiente fórmula:

$$C = Q / V$$

Siendo C capacidad, Q carga y V voltaje

El programa de registro calcula el área sobre la curva y para saber cuál es la capacidad se divide ese dato entre el voltaje aplicado (-10 mV). La capacidad se mide en pF (pico faradios). Este dato es una medida indirecta del tamaño de la célula, ya que cuanto mayor sea la célula mayor será la capacidad. La capacidad sirve para normalizar los datos de corriente que se obtengan mediante los registros.

10.1 Protocolos de registro de la corriente hERG (I_{hERG}) en células HEK-hERG.

Debido a que la línea HEK-hERG no expresa otros canales iónicos, para realizar los registros no se han empleado bloqueantes de otras corrientes iónicas. Para que la corriente que se registra sea realmente hERG, se debe sustraer de ella la corriente endógena. Para ello se usa la terfenadina, bloqueante de la corriente hERG y se realizan los mismos registros, los cuales corresponden a la corriente endógena.

Para estudiar los efectos de la inhibición mTOR sobre esta corriente se han medido distintos parámetros obtenidos mediante diferentes protocolos de registro. Dichos parámetros y protocolos se detallan a continuación.

10.1.1 Protocolo Corriente-Voltaje

Este protocolo nos permite obtener la Curva Corriente-Voltaje (I-V), la Curva de Activación y la Constante de Tiempo de Deactivación (τ_{deact}).

Curva Corriente-Voltaje

La curva corriente voltaje permite conocer la amplitud de la corriente hERG a diferentes voltajes. La amplitud será mayor a medida que aumente el voltaje ya que los canales salen del estado de reposo al estado inactivo. A medida los a voltajes sean más positivos, el paso de reposo a inactivo se hará cada vez más rápido. Esa amplitud depende de cuantos canales se abren a cada voltaje y de la fuerza electromotriz que ejerce el potencial transmembrana.

Para obtener la curva I-V se ha usado un protocolo de estimulación llamado protocolo IV, que consta de un prepulso y un pulso de cola. En el prepulso se aplican durante 2 segundos voltajes crecientes de 10 mV, desde -60 mV hasta +50 mV. Después, en el pulso de cola, se aplica un voltaje de -40 mV durante 5 segundos (Figura 38 arriba) del cual se consigue el registro correspondiente (Figura 38 abajo).

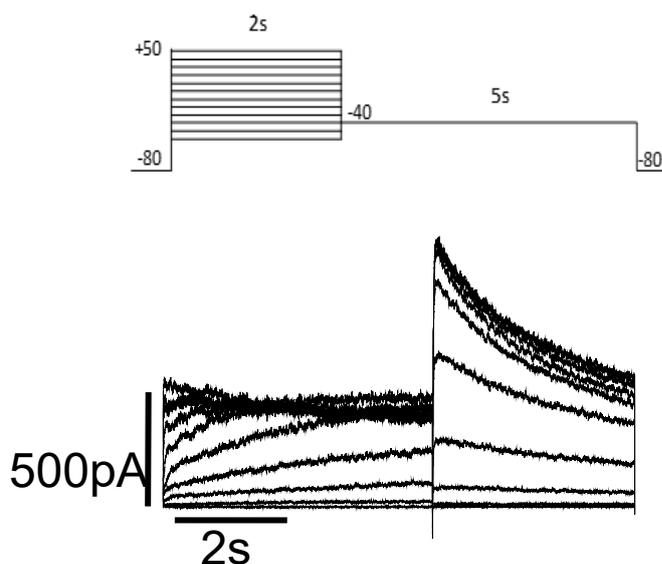


Figura 38. Protocolo corriente voltaje. Esquema de los voltajes aplicados y duración de cada pulso (arriba) y registro de la corriente I_{Kr} en condiciones control mediante protocolo IV (abajo)

La curva corriente voltaje se obtiene de la parte del final de prepulso midiendo la amplitud a cada voltaje y dividiéndolos entre la capacidad de la célula. De este modo se normaliza la corriente al tamaño de la célula (Figura 39).

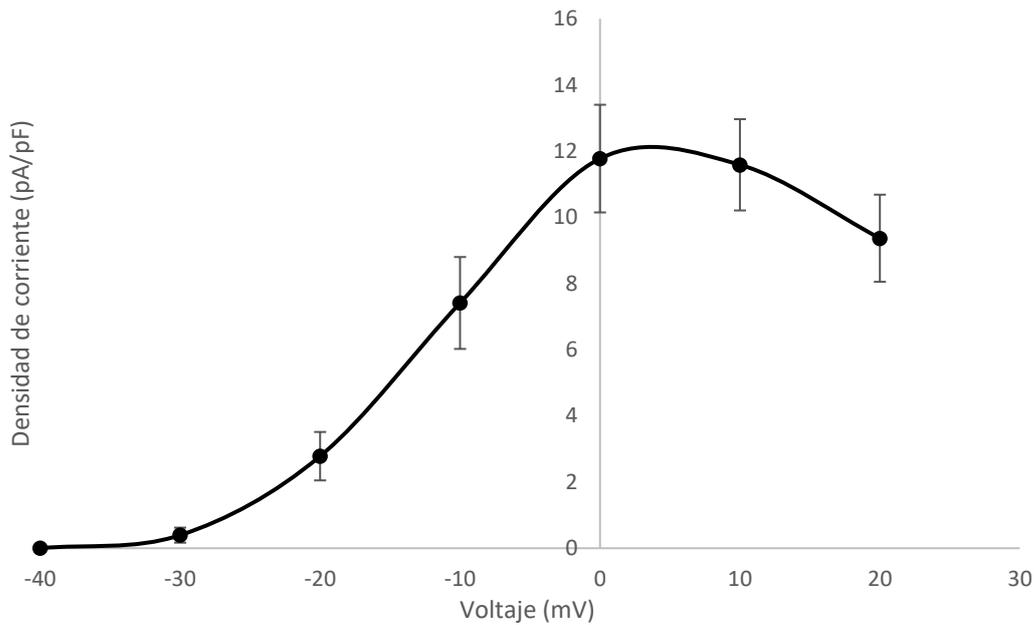


Figura 39. Curva corriente voltaje de la corriente hERG en condiciones control. Se observa como a voltajes positivos el aumento de la inactivación del canal se traduce en una disminución de la corriente

Curva de activación.

La curva de activación permite conocer la proporción de canales activos a cada voltaje. Para este parámetro se usa la parte del pulso de cola del protocolo de IV que lleva los canales a -40 mV para conseguir que pasen al estado activo. En el canal hERG no es posible el paso directo de estado inactivo a reposo, con lo cual, los canales que estaban en estado inactivo pasan a activo. A cada voltaje todos los canales que se hayan inactivado, pasan al estado activo antes de volver a reposo.

Para obtener los datos se mide la amplitud del pico de corriente de cola. El programa calcula una gráfica de la que se obtiene la amplitud corriente a cada voltaje y el voltaje medio de activación (V_{half}), es decir, el voltaje al cual el 50 % de los canales están en estado activo. Para obtener este valor, hay que ajustar la gráfica obtenida en el registro a una ecuación de Boltzman, la cual ajusta la gráfica a una sigmoide y calcula exactamente el dato del voltaje medio de activación. La curva de activación para la corriente hERG se representa como una sigmoide que a voltajes positivos alcanza una asíntota en torno al valor 1 (Figura 40).

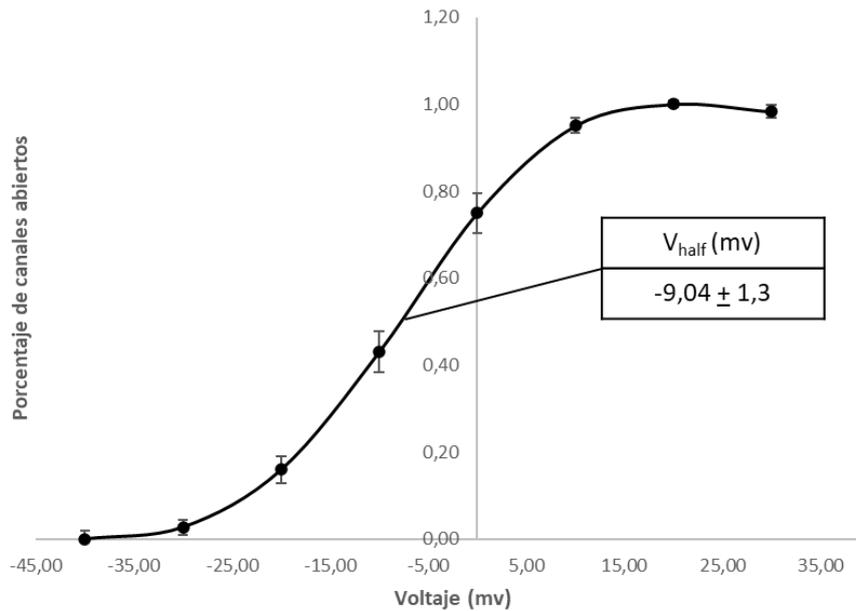


Figura 40. Curva de activación de la corriente hERG en condiciones control. Se muestra insertado el valor numérico del voltaje medio de activación (V_{half}).

Constante de tiempo de deactivación (τ_{deact}).

La constante de tiempo de deactivación nos dice el tiempo que tardan los canales el volver al estado de reposo, es decir, nos da información sobre la velocidad a la que los canales vuelven al estado de reposo. Para ello se ajusta la caída de la corriente de cola usando una ecuación exponencial de un solo componente, la cual calcula la pendiente de la caída del trazo de corriente a cada voltaje. En este caso se usa la constante de deactivación al voltaje más alto, +50 mV.

10.1.2 Protocolo Corriente-Voltaje Totalmente Activado

El Protocolo Corriente-Voltaje Totalmente Activado, “Fully Activated I-V” o más comúnmente llamado “Protocolo de Colas”, nos permite conocer el voltaje de inversión de la corriente. El voltaje de inversión de la corriente hERG es el voltaje a partir del cual cambia el sentido del movimiento de los iones de potasio, pasando de ser de entrada a ser de salida. El protocolo de colas consta también

de un prepulso y un pulso de cola. El prepulso consiste en llevar el voltaje de la membrana desde -80mV a +40mV durante 1 segundo. Este estímulo provoca que todos los canales abandonen el estado de reposo y pasen a estado inactivo. En el pulso de cola, partiendo de +40 mV, aplica voltajes crecientes de 10 mV desde -120 mV hasta +60 mV de durante 2 segundos (Figura 41 arriba) del cual se obtiene un registro en el que se observa una corriente de entrada hasta aproximadamente -80 mV y una corriente de salida de salida a voltajes más positivos (Figura 41 abajo).

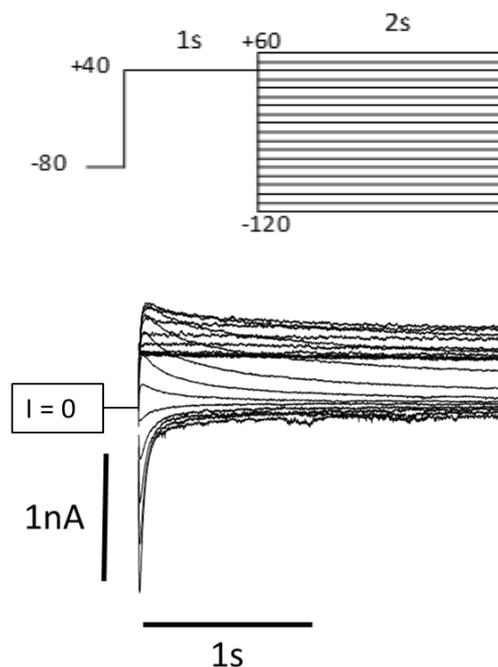


Figura 41. Protocolo corriente-voltaje totalmente activada en condiciones control. Esquema de los voltajes aplicados y duración de cada pulso (arriba) y registro de la corriente hERG en condiciones control mediante protocolo colas (abajo).

De este registro también se consigue una curva corriente voltaje pero con todos los canales activos, por lo que la amplitud de la corriente depende solamente de la fuerza electromotriz y de la capacidad del canal de conducir corriente (Figura 42). De este modo, el voltaje de inversión será el voltaje que corte el eje X donde la corriente es de 0 pA. La curva corriente voltaje que se obtiene de este protocolo se consigue del inicio del pulso y sirve para, entre otras cosas, medir con mayor precisión el voltaje de inversión.

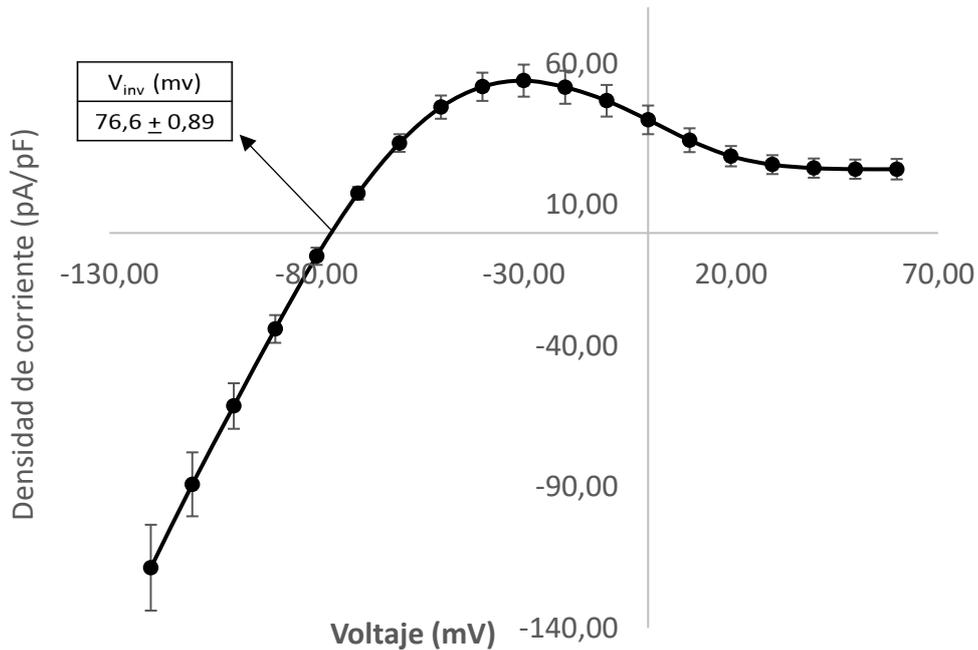


Figura 42. Curva corriente voltaje totalmente activada en condiciones control. Curva IV obtenida a partir del protocolo de colas.

10.1.3 Protocolo Amplitud de Corriente-Tiempo

Este protocolo se utiliza para ver el efecto agudo de una sustancia sobre una corriente a lo largo del tiempo. A diferencia del resto de registros, en este caso se ha registrado la corriente hERG aplicando el protocolo completo cada 15 segundos 140 veces, lo que hacen 35 minutos de registro. Las veces que se aplica el protocolo se establece en función del tiempo que se quiera registrar la corriente. El protocolo consta de un prepulso de -80 a +40 mV y un pulso de cola a -40 mV (Figura 43 arriba). La curva registro que se obtiene de este protocolo tiene un aspecto similar al del protocolo corriente-voltaje pero aplicando un único voltaje en el prepulso (Figura 43 abajo)

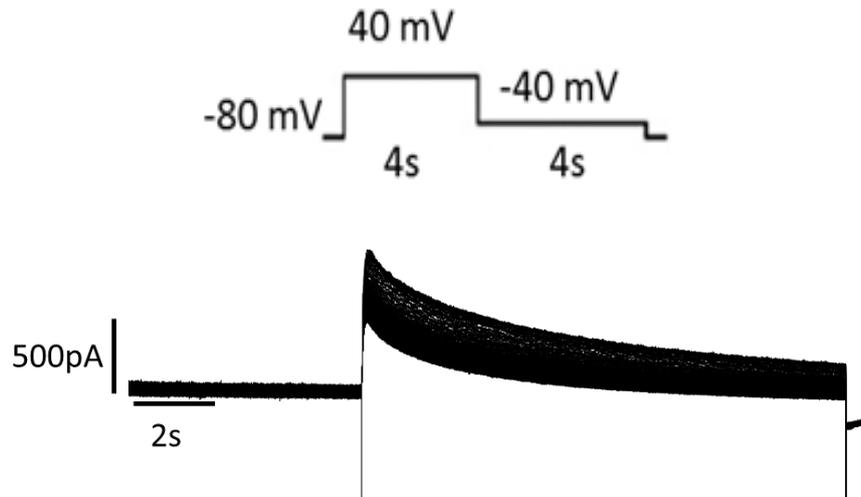


Figura 43. Protocolo amplitud de corriente-tiempo en condiciones control. Esquema de los voltajes aplicados y duración de cada pulso (arriba) y registro de la corriente hERG con el protocolo de amplitud corriente-tiempo (abajo).

La parte del protocolo que se utiliza a la hora de construir la curva es el pico de amplitud de corriente que se registra cada 15 segundos. Los valores obtenidos se relativizan al valor de amplitud más alto y se grafican respecto a tiempo (Figura 44).

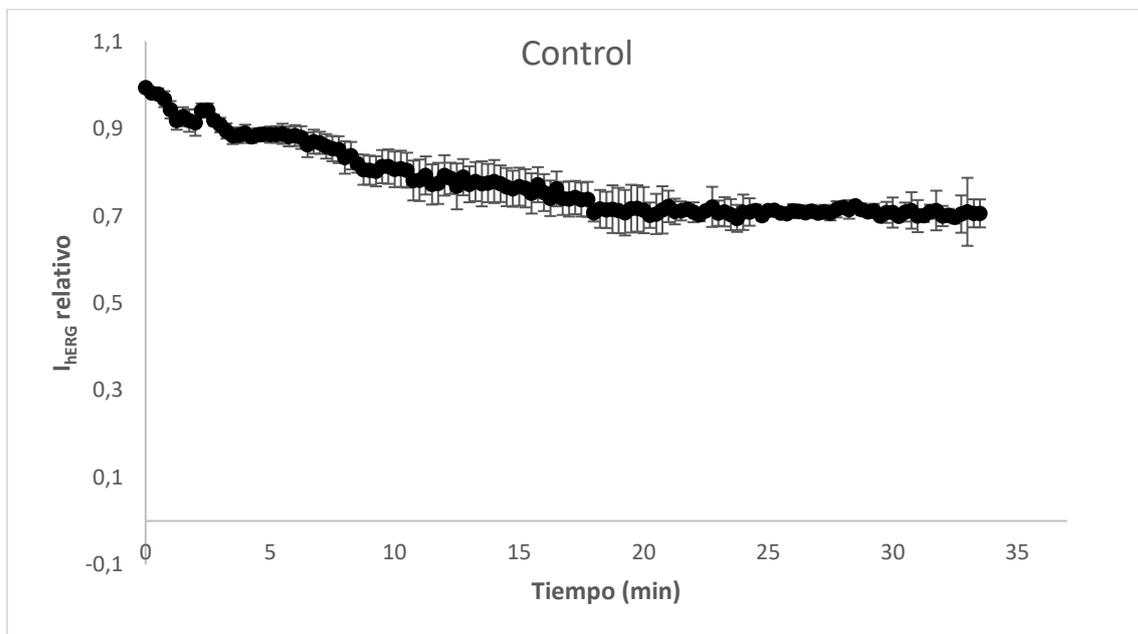


Figura 44. Curva corriente-tiempo en condiciones control. Curva obtenida a partir del protocolo de amplitud corriente-tiempo.

Con este protocolo se pretende ver el efecto agudo de un fármaco en la corriente hERG. En el sistema de perfusión se colocan dos soluciones externas, una de ellas con el fármaco a la concentración deseada y en la otra, como control, DMSO en la misma cantidad que el fármaco. Las células se perfunden con la solución control para iniciar los registros. Una vez comienza el registro, se pueden mantener en la solución con DMSO para registrar condiciones control o cambiar a la solución con el fármaco para observar sus efectos en el registro. El dato que se obtiene de este registro es el voltaje en el pico de la cola durante el tiempo que se aplica el protocolo, para poder observar el efecto del fármaco durante el tiempo.

10.2 Protocolo de registro de la corriente I_{Kur} en HL-1.

Las células HL-1 son una línea celular auricular y tienen diversos canales iónicos que conducen corrientes de sodio, potasio y calcio. Para poder registrar específicamente la corriente ultrarápida de potasio es necesario inhibir las demás. El bloqueo de los canales de calcio y de ciertos canales de potasio se consigue añadiendo cobalto y tetraetilamonio a la solución externa. Para inhibir la corriente de sodio se utiliza un potencial de mantenimiento de -60mV, voltaje al cual los canales de sodio están inactivados.

Para obtener la curva corriente voltaje de la I_{Kur} se ha usado un protocolo de estimulación que consta de un único pulso de voltajes crecientes de 10 mV, desde -40 mV hasta +50 mV, durante 500 ms (Figura 45 arriba) de la cual se obtiene el registro correspondiente (Figura 45 abajo).

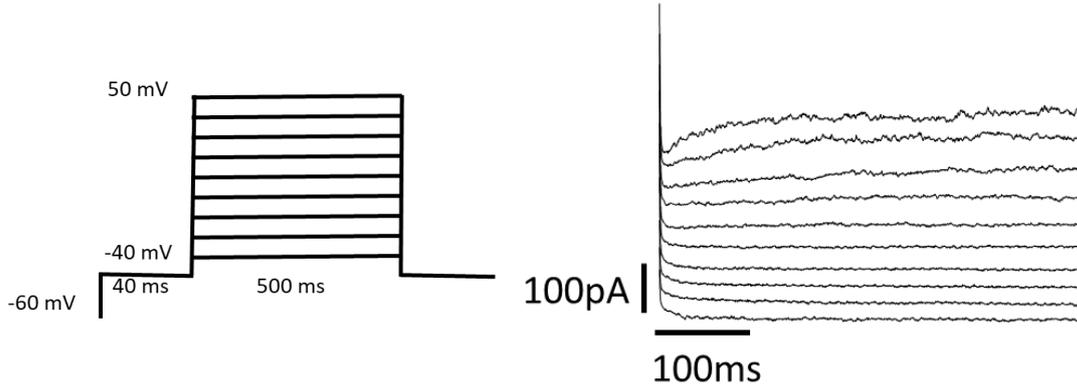


Figura 45. Protocolo corriente voltaje para I_{Kur} en condiciones control. Esquema de los voltajes aplicados y duración de cada pulso (izquierda) y registro de la corriente I_{Kur} en condiciones control mediante protocolo IV (derecha).

La curva corriente voltaje de la I_{Kur} se obtiene de la parte del final de pulso, midiendo la amplitud de corriente a cada voltaje y dividiéndola entre la capacidad de la célula (Figura 46).

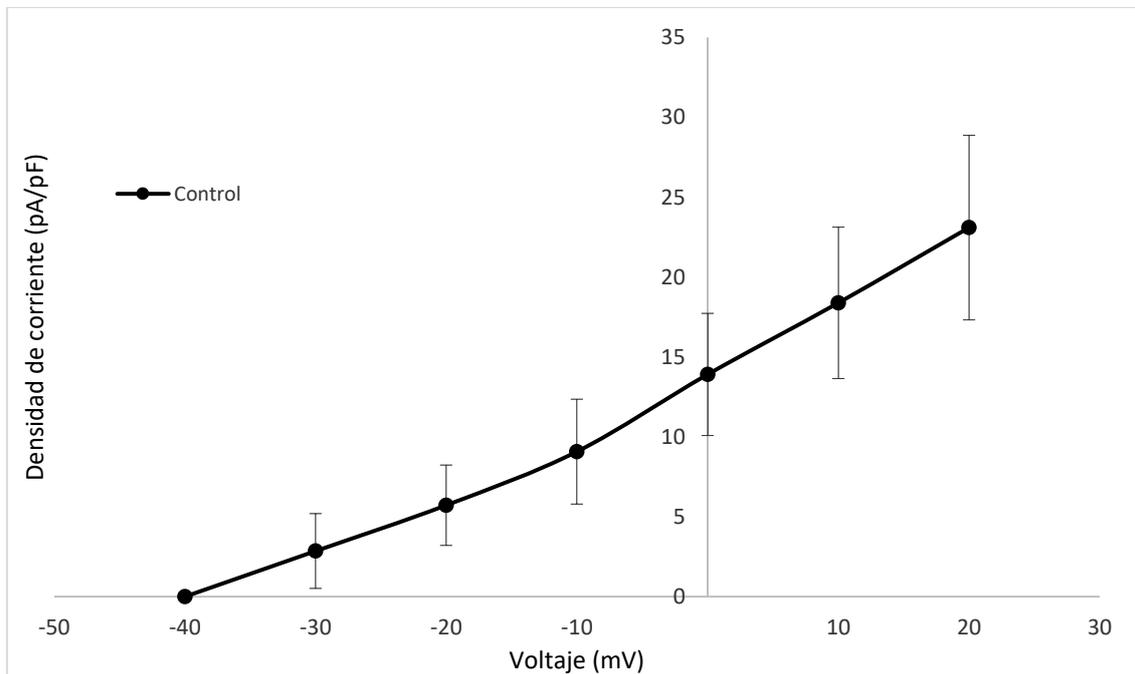


Figura 46. Curva corriente voltaje de la corriente I_{Kur} en condiciones control.

11. Análisis estadístico

A lo largo de todo el apartado de resultados, los datos se expresan como Media \pm Error Estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el test "t" de Student para muestras apareadas o no apareadas de las medias considerando estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Efecto de la incubación durante 24h con Rapamicina sobre la corriente IhERG

1.1 Efecto de la inhibición crónica de mTOR sobre la IhERG

Con el objetivo de estudiar el efecto de la inhibición de mTOR sobre la IhERG, las células HEK-hERG fueron incubadas durante aproximadamente 24h con DMSO (control) o con una de las siguientes concentraciones de rapamicina: 0.05, 0.5 y 5 μM . Pasado el tiempo de incubación, se realizaron los registros de corriente.

1.2 El tratamiento con Rapamicina durante 24h aumentó la amplitud de la corriente IhERG

Los registros realizados en las células HEK-hERG incubadas con Rapamicina mostraron un aumento de la amplitud de corriente respecto a control de manera dependiente de concentración (Figura 47).

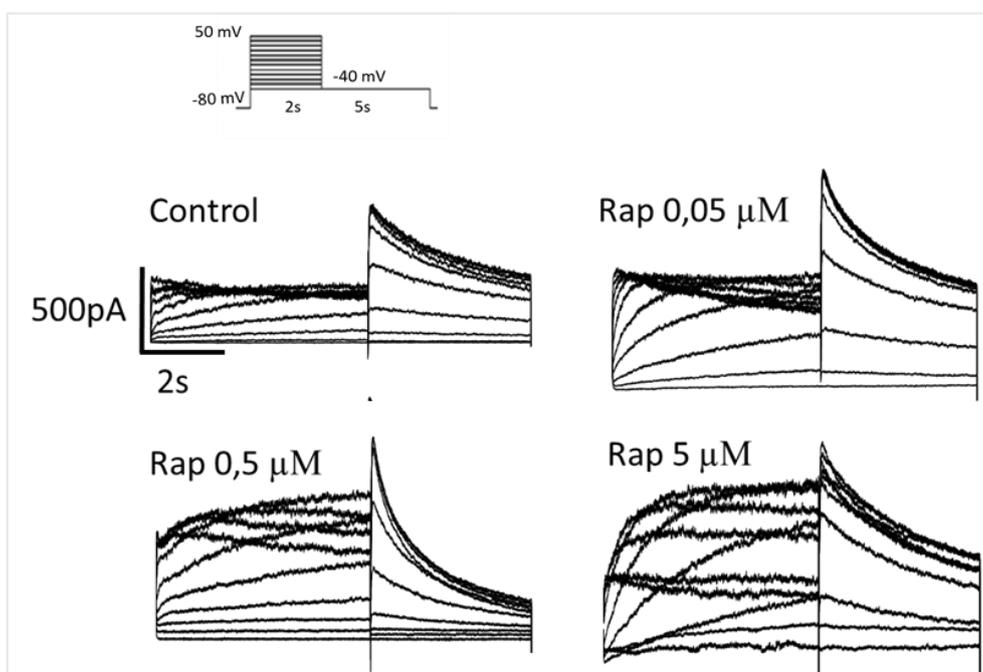


Figura 47. Efecto de la Rapamicina en la corriente hERG. Registros representativos de células HEK-hERG control (incubadas con DMSO) e incubadas durante 24h con diferentes concentraciones de Rapamicina. El esquema de la parte superior describe el protocolo de registro.

Al normalizar la amplitud de la corriente de cada célula por su capacidad se obtiene la densidad de corriente. Este parámetro permite comparar los valores obtenidos en células distintas. Las curvas I-V presentan valores más altos en las células incubadas con Rapamicina que en las células control. Ese aumento se observa prácticamente a todos los voltajes testados y es mayor cuanto mayor es la concentración de Rapamicina. Por lo tanto, la incubación con Rapamicina aumenta la densidad de la corriente conducida a través del canal hERG y el efecto es dependiente de concentración (Figura 48).

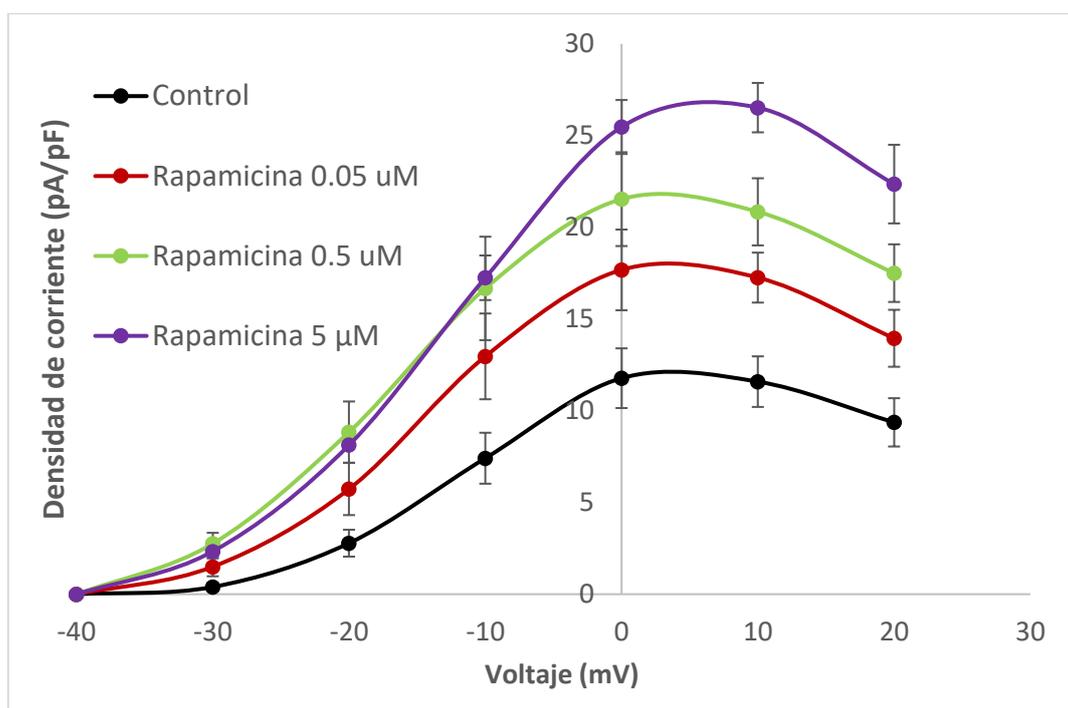


Figura 48. Efectos de la Rapamicina en la densidad de corriente hERG. Densidad de corriente hERG a diferentes voltajes en células control (incubadas con DMSO) e incubadas durante 24h con Rapamicina. Control: N=14; Rapamicina 0.05 u 0.5 μ M N=10; Rapamicina 5 μ M N=7

La I_{hERG} alcanza el pico máximo de corriente en torno a los 0 o +10 mV. Al analizar el efecto de la incubación con Rapamicina sobre la densidad de corriente a ambos voltajes (Figura 49), se observa un aumento con todas las concentraciones de Rapamicina testadas. El efecto es similar a ambos voltajes. Así, a 0 mV el aumento de la densidad de corriente observado fue de un 51, 83 y 113% respectivamente. A +10 mV el aumento fue muy similar, siendo de 48, 77 y 111% respectivamente.

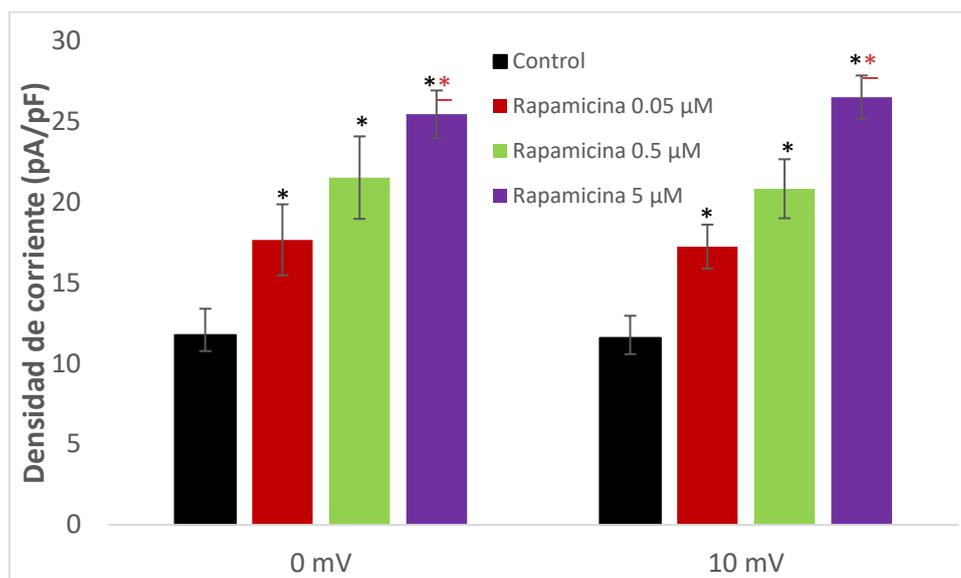


Figura 49. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente hERG a y +10 mV. Densidad de corriente hERG a 0 mV y +10 mV en células control (incubadas con DMSO) o incubadas durante 24h con distintas concentraciones de rapamicina durante 24h. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Control: N=14; Rapamicina 0.05 u 0.5 μM N=10; Rapamicina 5 μM N=7.

1.3 El tratamiento con Rapamicina durante 24h no alteró el voltaje medio de activación del canal hERG

Ajustando el pico de las colas de IhERG a una ecuación sigmoide de Boltzman se obtiene la curva de activación del canal. Nuestros resultados mostraron que las curvas de activación son similares en condiciones control y tras la incubación con cualquiera de las concentraciones de rapamicina (Figura 50).

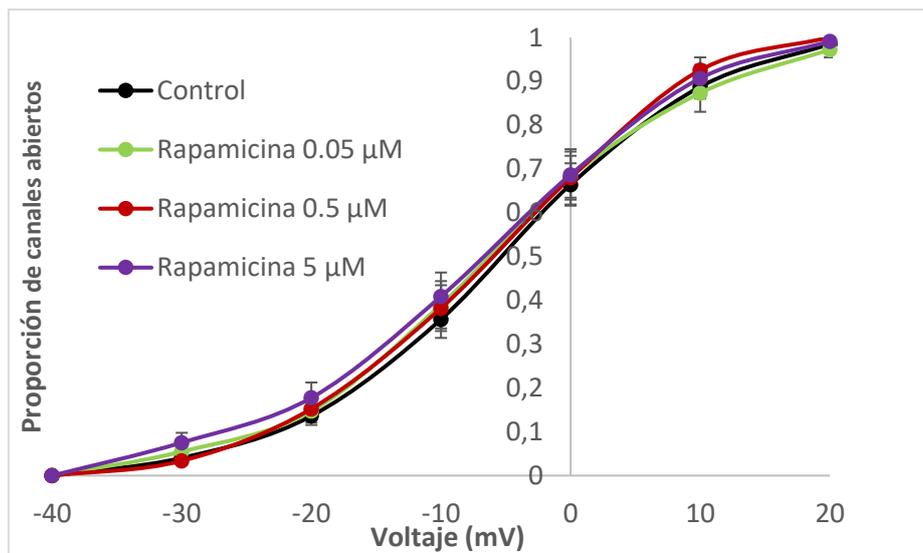


Figura 50. Efecto de la Rapamicina en la curva de activación de la corriente hERG. Curva de activación de la corriente hERG en células control (incubadas con DMSO) o incubadas durante 24h con distintas concentraciones de Rapamicina. Control: N=14; Rapamicina 0.05 u 0.5 µM N=10; Rapamicina 5 µM N=7.

Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el voltaje medio de activación del canal hERG (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la Rapamicina en el voltaje medio de activación de la corriente hERG. Voltaje medio de activación del canal hERG en condiciones control y en células incubadas durante 24h con distintas concentraciones de Rapamicina. Control: N=14; Rapamicina (R) a todas las concentraciones N=10.

Grupo	V _{half}
Control	-4.7 ± 1,45
R 0,05 µM	-5.06 ± 2.5
R 0,5 µM	-5.9 ± 1,7
R 5 µM	-5.8 ± 1.8

1.4 El tratamiento con Rapamicina durante 24h no alteró la constante de tiempo de deactivación del canal hERG

Ajustando al caída de las colas de la corriente IhERG a una ecuación monoexponencial se obtiene la constante de tiempo de deactivación (τ_{deact}) del canal. Los resultados mostraron que la incubación con Rapamicina no alteró de manera significativa la constante de tiempo de deactivación, es decir, no altera la velocidad a la que el canal hERG vuelve al estado de reposo (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la Rapamicina en la constante de tiempo de deactivación de la corriente hERG. Constante de tiempo de deactivación (τ_{deact}) en condiciones control y en células incubadas durante 24h con distintas concentraciones de Rapamicina. Control: N=14; Rapamicina (R) a todas las concentraciones N=10.

Grupo	τ_{deact}
Control	1378 \pm 132,5
R 0,05 μ M	1087,8 \pm 117,7
R 0,5 μ M	1094,6 \pm 17,03
R 5 μ M	1185,3 \pm 75.3

1.6 El tratamiento con Rapamicina durante 24h no alteró el voltaje de inversión del canal hERG

Otro de los parámetros medidos fue el voltaje de inversión, es decir, el voltaje a partir del cual la corriente hERG pasa a ser de salida a ser de entrada. Este parámetro se obtuvo a partir del protocolo de colas ya que permite registrar tanto corriente de entrada como de salida. Los resultados no mostraron diferencia significativa en el voltaje de inversión entre el grupo control y los grupos tratados con Rapamicina (Tabla 3). A partir del registro se obtuvo la curva corriente voltaje que muestra la densidad de corriente totalmente activada. Al igual que en el V_{inv} tampoco se encontraron diferencias (Figura 51).

Tabla 3. Efecto de la Rapamicina en el voltaje de inversión del canal hERG. Voltaje de inversión en condiciones control y en células incubadas durante 24 h con distintas concentraciones de Rapamicina. Control: N=14; Rapamicina en todas las concentraciones N=10.

Grupo	V_{inv}
Control	$76,6 \pm 0,89$
R 0,05 μM	$76,55 \pm 0,37$
R 0,5 μM	$76,6 \pm 0,31$
R 5 μM	$76,2 \pm 0,5$

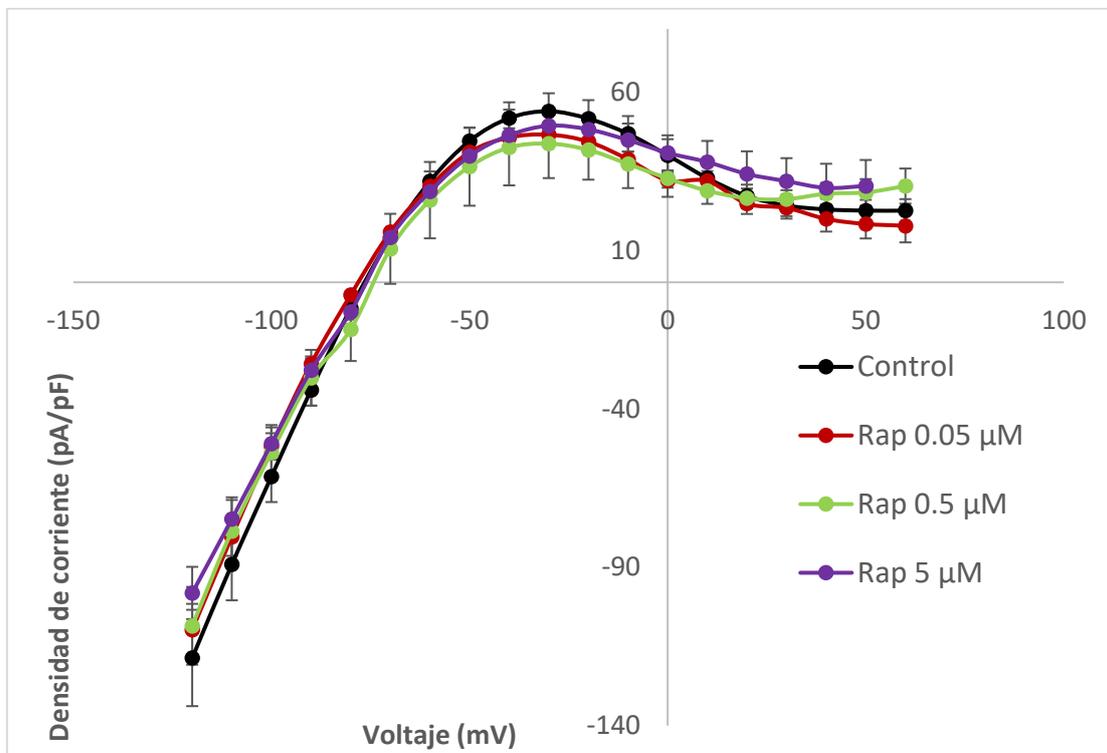


Figura 51. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente hERG totalmente activada. Densidad de corriente hERG obtenida del protocolo corriente voltaje totalmente activada en células control (incubadas con DMSO) e incubadas durante 24h con distintas concentraciones de Rapamicina. Control: N=14; Rapamicina a todas las concentraciones N=10.

1.7 La Rapamicina no tuvo efecto agudo en la corriente hERG

Con el fin de testar si la Rapamicina tiene un efecto directo en el canal uniéndose a él, las células HEK-hERG fueron perfundidas con solución externa con DMSO como control o con solución externa con Rapamicina a la concentración de 5 μM . El protocolo de amplitud corriente-tiempo, que consiste en aplicar un único prepulso a +40 mV y un pulso a -40 mV, se aplicó a las células durante 35 minutos. Los resultados mostraron registros similares en los grupos perfundidos con solución externa con DMSO como control y los grupos registrados con solución con Rapamicina 5 μM en los 35 minutos de registro. (Figura 52).

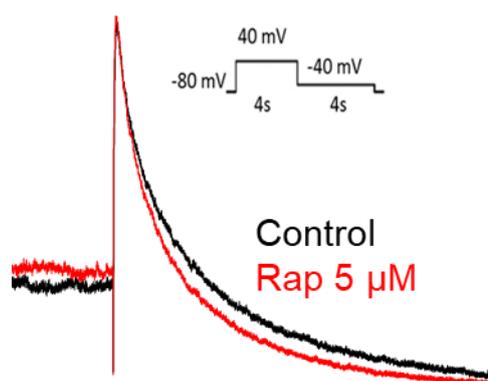


Figura 52. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG. Registros de corriente hERG obtenidos en una célula en condiciones control perfundida con solución externa con DMSO y en una célula perfundida 35 minutos con solución externa con Rapamicina (Rap).

A partir de los 5 minutos de registro, se observa una caída lenta de la amplitud de la corriente hERG en condiciones control, conocida como “Run Down”. En presencia de rapamicina, la velocidad de caída se superpone exactamente con la velocidad de caída en condiciones control, lo que indica que no se trata de una interacción directa entre el canal y el fármaco (Figura 53).

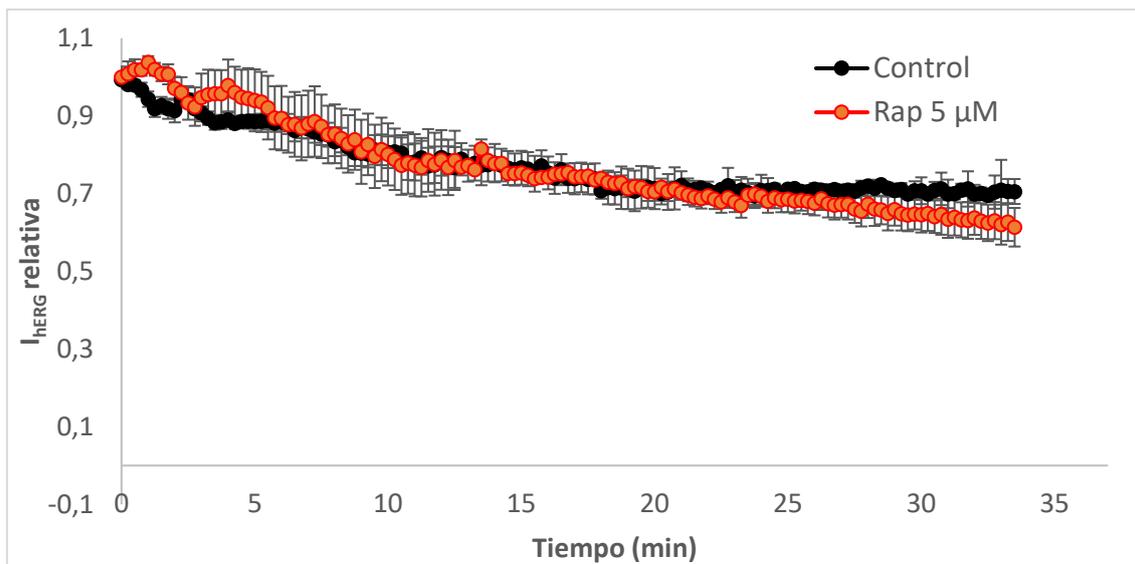


Figura 53. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG tras 35 minutos de exposición a la Rapamicina. Corriente hERG normalizada al pico máximo corriente. Células control perfundidas con solución externa con DMSO y perfundidas con solución externa con Rapamicina 5 µM durante 35 minutos. Control, Rapamicina 5 µM N = 6-9.

Descartado que la rapamicina hiciera su efecto uniéndose directamente al canal se quiso comprobar que la Rapamicina no estuviera activando otras enzimas que pudieran estar actuando sobre hERG y produciendo un aumento en la corriente. Con este objetivo, las células fueron incubadas durante 35 minutos con solución externa con DMSO como control o con solución externa con Rapamicina 5 µM y posteriormente se realizaron de nuevo registros con el protocolo de amplitud corriente-tiempo en las mismas condiciones, durante otros 35 minutos. La incubación previa nos permite observar que sucede con la caída de la corriente durante más tiempo sin necesidad de mantener la célula en registro y poner en riesgo su integridad. Los resultados mostraron registros similares en los grupos perfundidos con solución externa con DMSO y los grupos perfundidos con solución externa con Rapamicina 5 µM en los 35 minutos de registro posteriores a la incubación (Figura 54).

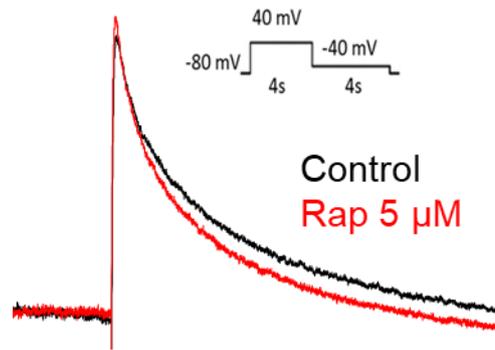


Figura 54. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG tras 35 minutos de incubación con Rapamicina. Registros de corriente hERG en una célula en condiciones control perfundida con solución externa con DMSO y en una célula perfundida 35 minutos con solución externa con Rapamicina (Rap) tras una incubación previa de 35 minutos con DMSO o Rapamicina

Para estos registros también se usó el run down como parámetro para determinar si la Rapamicina estaba haciendo o no efecto sobre el canal mediante otras enzimas o segundos mensajeros. De nuevo, los resultados mostraron curvas similares entre las células incubadas y perfundidas con DMSO como control e incubadas y perfundidas con Rapamicina 5 μM durante aproximadamente 3 minutos (Figura 55).

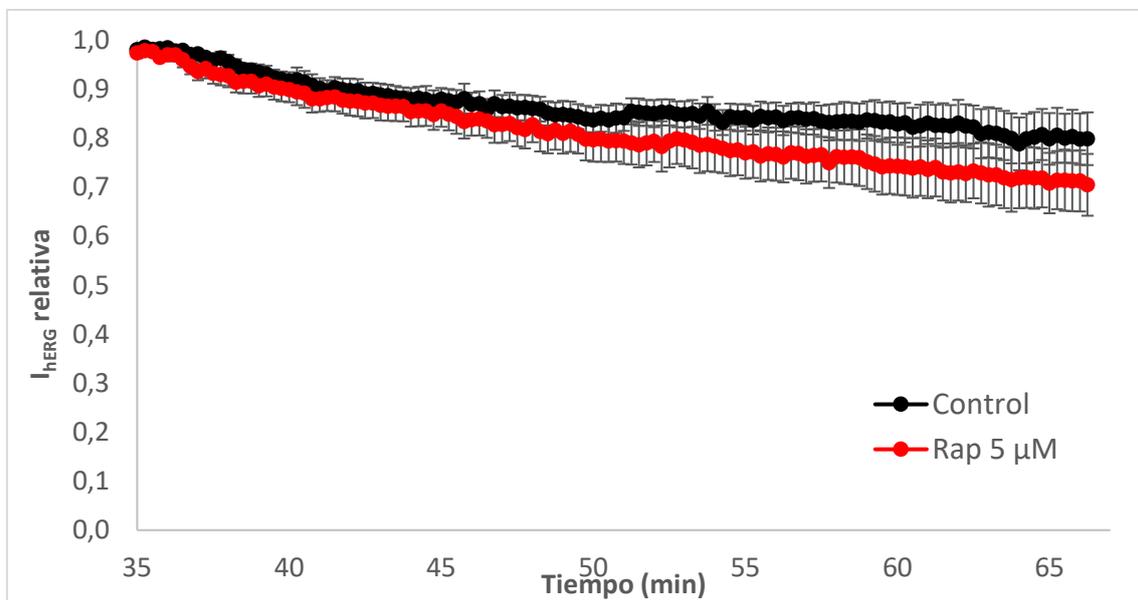


Figura 55. Efecto de la Rapamicina en el “run down” de la corriente hERG tras 65 minutos Corriente hERG normalizada al pico máximo de corriente. Células control perfundidas con solución externa con DMSO y perfundidas con solución externa con Rapamicina 5 μM durante los 35 minutos posteriores a la incubación con DMSO o Rapamicina. Control, Rapamicina 5 μM . N = 6-9.

En conjunto, este grupo de resultados indica que la rapamicina no tiene un efecto agudo, inespecífico y desconocido sobre el canal hERG.

1.8 El aumento de la corriente hERG se debe a la inhibición de mTOR

A continuación, quisimos confirmar si el aumento de la densidad de corriente hERG que obteníamos tras la incubación con Rapamicina se debía a la inhibición de mTOR. Para ello, sustituimos la Rapamicina por Torina-1, un inhibidor de mTOR que también inhibe a ambos complejos, mTORC1 y mTORC2. Los resultados mostraron que la incubación con Torina-1 3 μM durante 24h también aumentó significativamente la densidad de corriente hERG respecto a control (Figura 56).

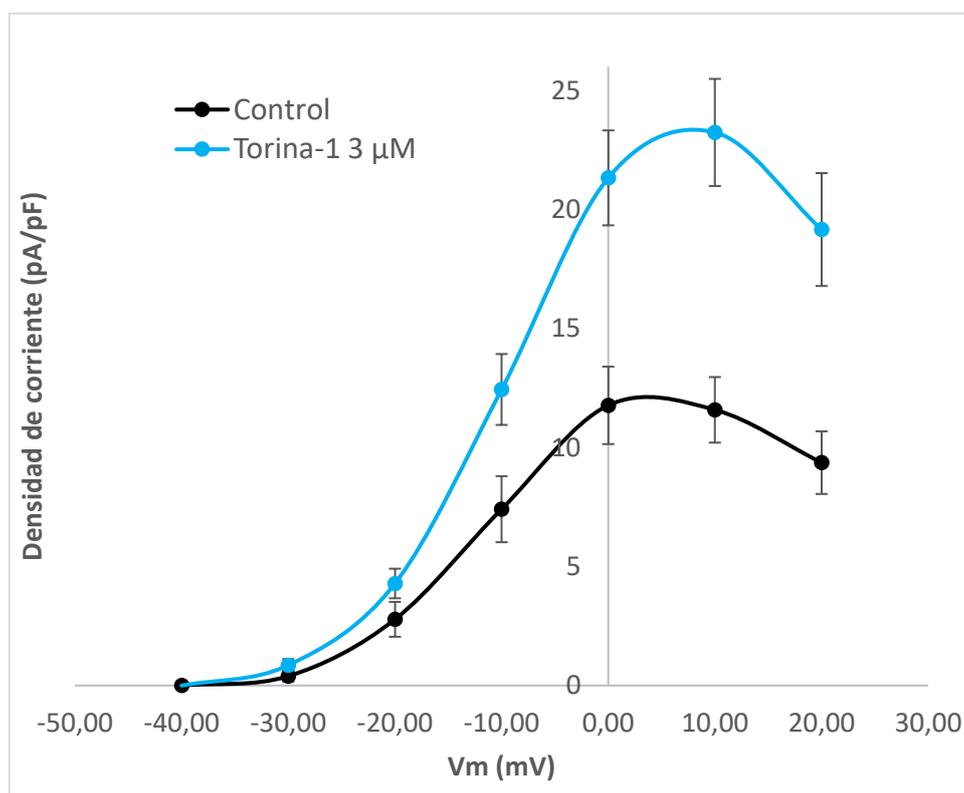


Figura 56. Efecto de la Torina en la densidad de corriente hERG. Densidad de corriente IhERG a diferentes voltajes en células control e incubadas durante 24h con Torina-1 3 μM . Control: N=14; Torina 3 μM N=14.

Tomando el valor a +10 mV como voltaje al que se alcanza el pico máximo de corriente, se observó un aumento significativo de densidad de corriente en las

células incubadas con Torina-1 respecto a las del grupo control. Concretamente, se obtuvo un aumento del 100%, que es muy similar al obtenido tras la incubación con la concentración más alta de Rapamicina (5 μ M) usada en experimentos anteriores (111%) (Figura 57).

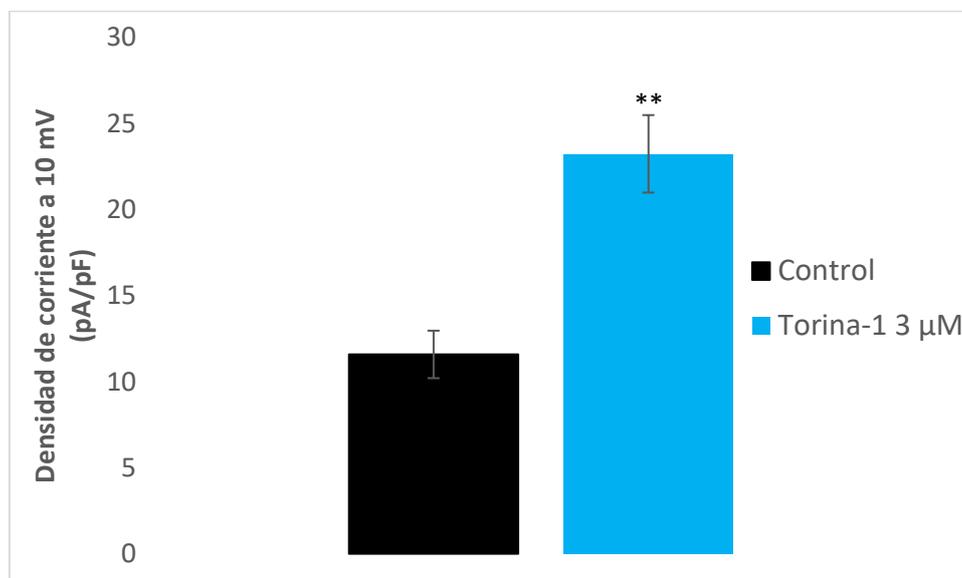


Figura 57. Efecto de la Torina en la densidad de corriente hERG a 10 mV. Densidad de corriente hERG a +10 mV en células control o incubadas con Torina-1 3 μ M durante 24h. ** $p < 0.01$. Control N=14; Torina 3 μ M N=10.

2. Efectos de la inhibición de mTOR durante 24h sobre la cantidad de canales hERG

2.1. El tratamiento durante 24h con Rapamicina aumentó la cantidad de canales hERG

Para comprobar si el aumento de la densidad de corriente se debía a un aumento en la cantidad de canales hERG disponibles, las células HEK-hERG en condiciones control incubadas con DMSO y tratadas con Rapamicina 0.05 y 5 μ M durante 24h fueron recogidas y lisadas para detectar el canal hERG mediante western blot. Al igual que con la densidad de corriente, las células HEK-hERG tratadas con Rapamicina mostraron una mayor cantidad de canal hERG respecto

a control del 38% para la contracción de 0.05 μM y del 99% para la concentración de 5 μM , siendo el aumento a esta concentración estadísticamente significativo (Figura 58).

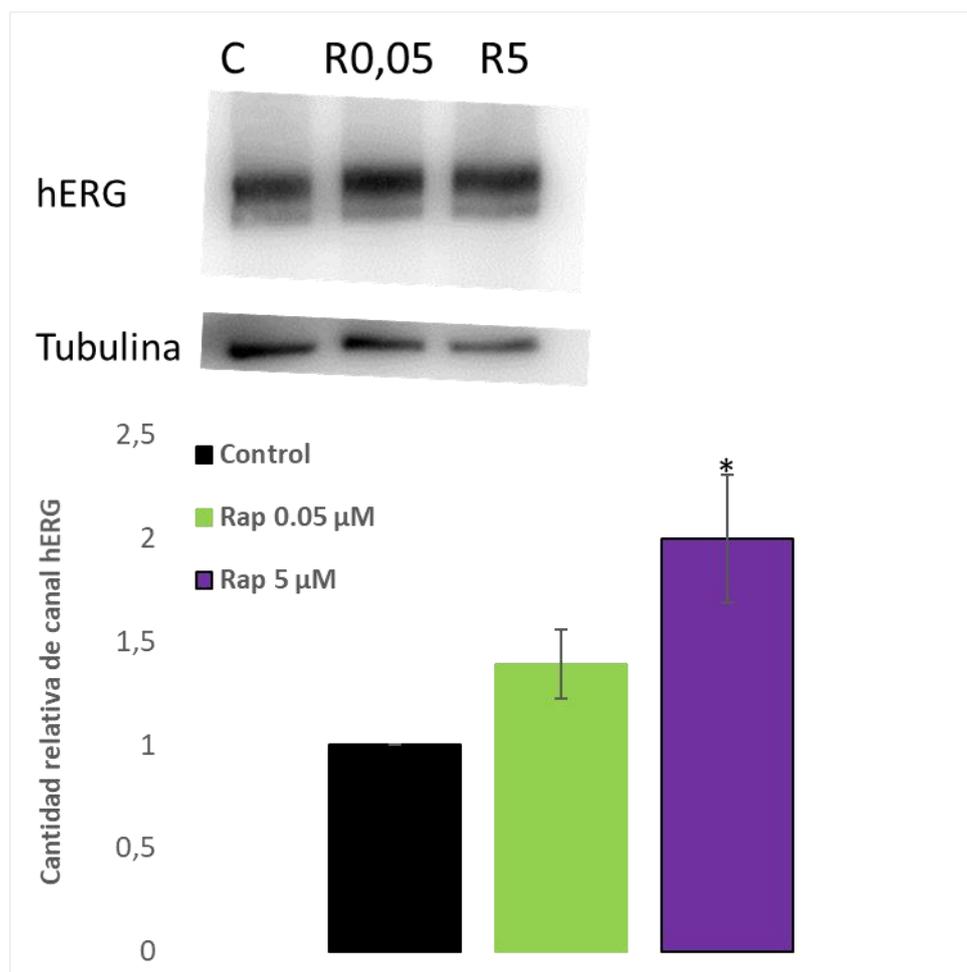


Figura 58. Efecto de la Rapamicina en la expresión de canales hERG. Análisis de expresión del canal hERG en condiciones control y en células incubadas durante 24h con diferentes concentraciones de Rapamicina. Imagen de revelado de western blot (arriba) y gráfico de intensidad de banda total (abajo) obtenida a través de image J. Las bandas fueron normalizadas usando Tubulina * $p < 0.05$. Control y Rap0,05: N=11; Rap5: N=5.

2.1.1 El tratamiento con Torina-1 3 μM durante 24h también aumentó la expresión de canal hERG

Al igual que con la densidad de corriente, para confirmar que la Rapamicina aumenta la expresión de corriente a través de la inhibición del

complejo mTOR se sustituyó la Rapamicina por Torina-1 3 μ M. Las células HEK-hERG control e incubadas con Torina-1 se recogieron y se lisaron para el posterior western blot. Los resultados mostraron un aumento significativo respecto a control de la expresión del canal hERG del 70% (Figura 59).

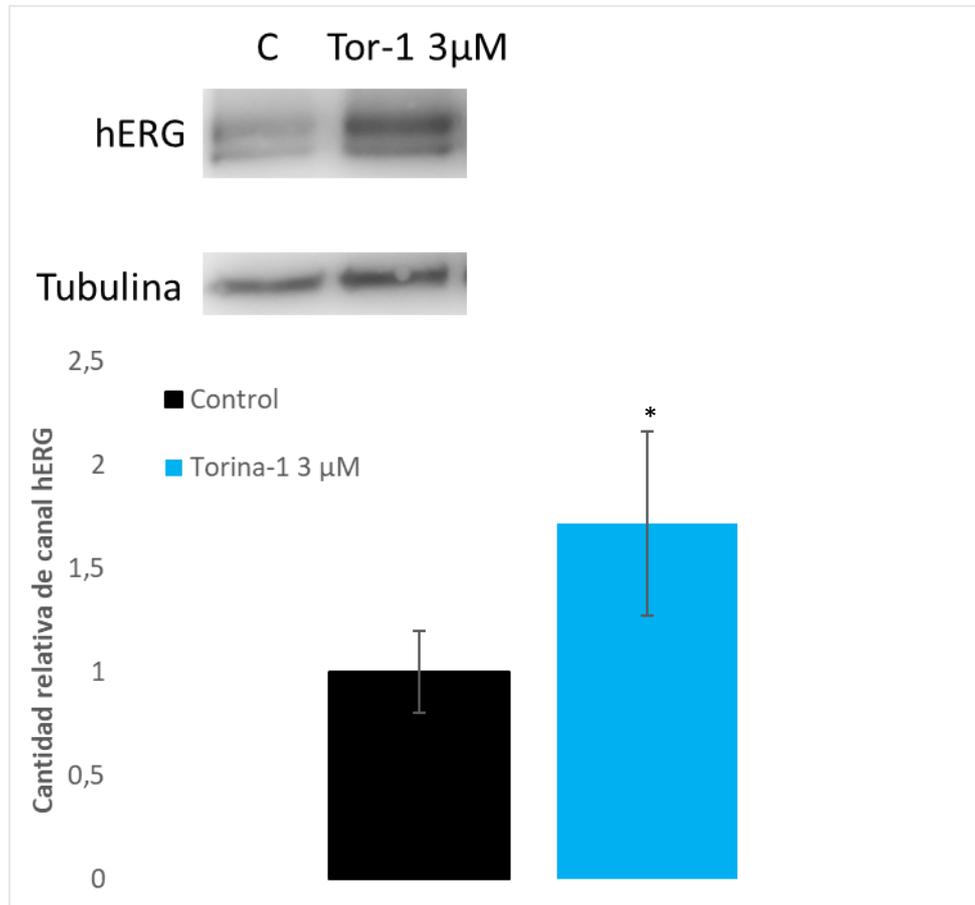


Figura 59. Efecto de la Torina en la expresión de canales hERG. Análisis de la expresión del canal hERG en condiciones control y en células incubadas durante 24 h con Torina 3 μ M. Imagen de revelado de Western Blot (arriba) y gráfico de intensidad de banda total (abajo) obtenida a través de image j. Las bandas fueron normalizadas usando Tubulina * $p < 0.05$. Control; Torina 3 μ M N=4.

2.2 El tratamiento con Rapamicina durante 24h aumentó el tráfico del canal hERG a la membrana

Una vez comprobado que la Rapamicina aumentaba la densidad de corriente mediante un aumento de la expresión del canal hERG, se analizó el efecto de la incubación con rapamicina sobre el tráfico del canal hERG a la membrana plasmática. Para ello, en los western blots realizados se comparó el

ratio de banda de 155 KDa, completamente glicosilada y madura, respecto a la cantidad total (es decir, la suma de las dos bandas). Este cociente se usó como medida indirecta del tráfico de canal hERG a membrana, ya que la proteína madura se localiza principalmente en membrana. El aumento del ratio de la banda madura frente a la total indica que el tráfico del canal a la membrana es mayor. Los resultados mostraron que en las células incubadas con Rapamicina 5 μ M el ratio era un 20% mayor que el obtenido en células control (Figura 60).

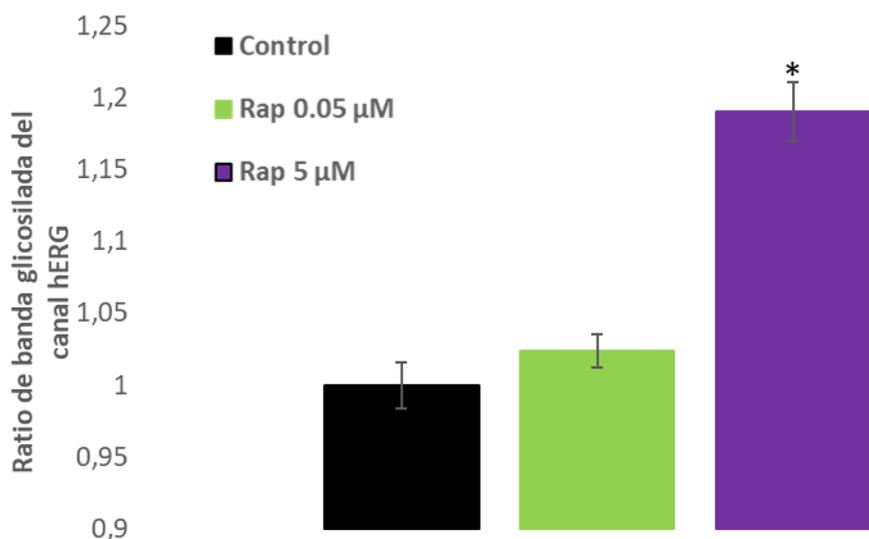


Figura 60. Efecto de la Rapamicina en el ratio de glicosilación de canales hERG. Ratio de glicosilación del canal hERG. Misma imagen de western blot del canal en condiciones control y en células incubadas durante 24h con diferentes concentraciones de Rapamicina mostrada en la figura 57 (arriba) y gráfico de intensidad de banda madura frente a banda total (abajo) obtenida a través de image J. Las bandas fueron normalizadas usando Tubulina. * $p < 0.05$. Control, Rap0,05 μ M: N=11; Rap5 μ M: N=5.

3.Efectos de la inhibición de mTOR durante 24h en el recambio (Turnover) del canal hERG

3.1 El tratamiento con Rapamicina durante 24h aumentó la síntesis de proteína sin afectar a su degradación

Para profundizar en el mecanismo mediante el cual la inhibición de mTOR aumentaba la cantidad de corriente hERG, analizamos el efecto de la incubación

con Rapamicina sobre la síntesis y degradación del canal. Utilizamos cicloheximida (CHX) para bloquear la síntesis de proteínas *de novo* e inhibimos la degradación por proteasoma mediante el inhibidor específico 26S MG132. En una nueva serie de experimentos se incubaron durante 24h las células HEK-hERG control y células incubadas con Rapamicina 5 μM con CHX 10 $\mu\text{g/ml}$, MG132 30 μM y sin ninguno de los dos. Los resultados mostraron un aumento significativo respecto a control de la expresión del canal hERG del 160% en los grupos tratados con Rapamicina 5 μM . En presencia de CHX el aumento observado desaparecía mientras que en presencia de MG132 el aumento respecto a control fue del 525%, aún mayor que solo con Rapamicina 5 μM (Figura 61). Estos resultados muestran en definitiva que en ausencia de inhibición proteasomica del canal hERG la proteína se acumula, lo que indica que la síntesis de proteína es mayor en presencia de la Rapamicina.

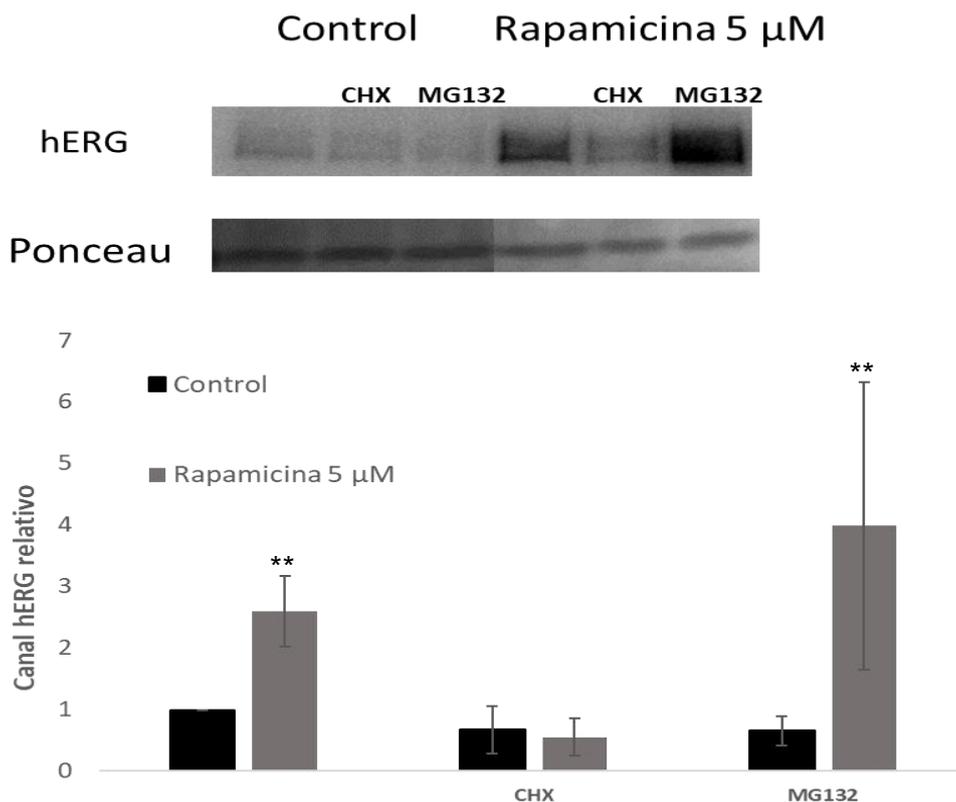


Figura 61. Efecto de la Rapamicina sobre la síntesis y degradación de canales hERG. Gráfico de la intensidad de bandas en condiciones control y en células incubadas con Rapamicina en ausencia y presencia de CHX 10 $\mu\text{g/ml}$, y MG132 30 μM . Imagen de western blot (arriba) y gráfico de porcentaje de intensidad de bandas obtenida a través de image J. Las

bandas fueron normalizadas a las bandas del rojo ponceau. ** $p < 0.01$ Control, Rapamicina 5 μM : N=3.

4.Efectos de la inhibición de mTOR en la transcripción del canal hERG

4.1 La incubación con Rapamicina 24h no alteró la expresión de mRNA del canal hERG

Otro mecanismo mediante el cual la Rapamicina podía aumentar la cantidad de canal hERG es un aumento a nivel de transcripción de mRNA. Comprobamos esta posibilidad realizando una RT-qPCR del gen KCNH2 en células incubadas 24 h en condiciones control o en células incubadas con Rapamicina a diferentes concentraciones (0.05 y 5 μM). Los resultados de la qPCR, expresados en forma de $2^{\Delta\Delta\text{Cq}}$, no mostraron diferencias significativas respecto a control en ninguna de las concentraciones (Figura 62). Los Cq del gen KCNH2 fueron relativizados respecto a los Cq del gen GAPDH.

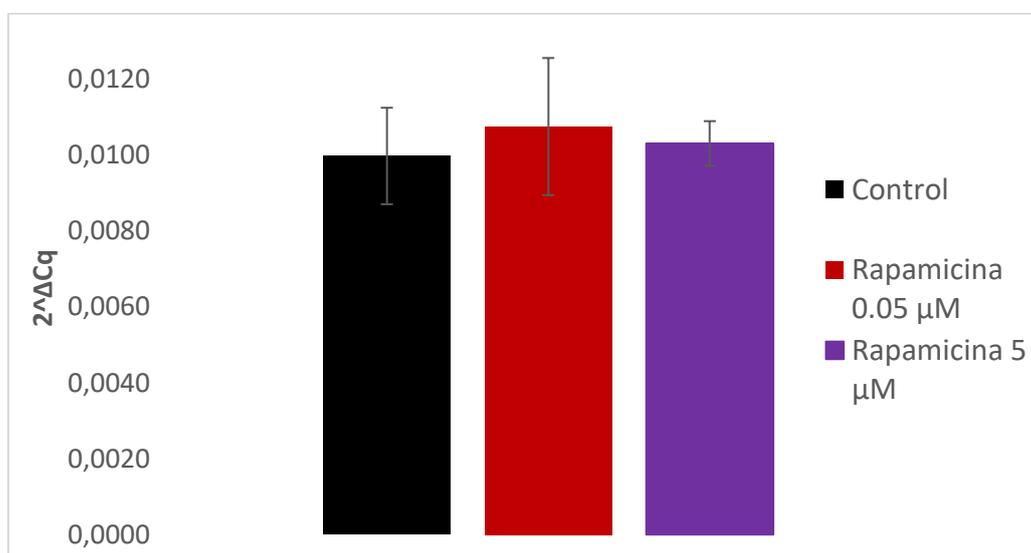


Figura 62. Efecto de la Rapamicina en la transcripción de canales hERG. $2^{\Delta\Delta\text{Cq}}$ del canal hERG en condiciones control y en células incubadas con diferentes concentraciones de Rapamicina. Control; Rapamicina en ambas concentraciones N=4. Los genes normalizadores usados fueron TUBA1, GAPDH, UBC y TOP1. Se muestran los resultados referidos a GAPDH.

Confirmado que el aumento de la corriente hERG fue causado por la inhibición de mTOR, provocando un aumento de la traducción y el tráfico a membrana del canal hERG.

5. Papel de mTOR-C1 y mTOR-C2 en el aumento de la expresión de hERG

Otro de los objetivos de la presente Tesis Doctoral era esclarecer cuál de los dos complejos de mTOR, mTORC1 o mTORC2, era el responsable de los efectos observados sobre la corriente hERG. Para ello, en otra serie de experimentos utilizamos siRNAs para silenciar a Raptor o a Rictor, que son proteínas clave en los complejos mTORC1 y mTORC2 respectivamente.

5.1 El silenciamiento de Rictor no modifica la expresión de hERG

En primer lugar realizamos experimentos de puesta a punto para comprobar si el silenciamiento era efectivo, ya que los siRNAs no inhiben completamente la expresión de las proteínas de interés. Para determinar el grado de silenciamiento de Rictor las células HEK-hERG se incubaron con 2 μ g de siRICTOR durante 24, 48 y 72h o solo con el vehículo de transfección como control. El vehículo en este caso fue lipofectamina. Transcurrido ese tiempo las células se lisaron y se realizó un western blot tiñiendo Rictor (Figura 59). Los resultados mostraron que a las 48h la expresión de Rictor estaba reducida un 40% en las células incubadas con siRICTOR respecto al grupo control. Sin embargo, a las 72h esa diferencia comienza a revertirse. Por lo tanto, se determinó que el tiempo óptimo de silenciamiento se alcanzaba a las 48h y se descartó realizar incubaciones más largas.

A continuación analizamos cómo afectaba el silenciamiento de Rictor, y por consiguiente la inhibición parcial de mTORC2, a los niveles del canal hERG (Figura 63). El inmunomarcado de hERG fue similar en el grupo control y en los grupos con siRICTOR. Estos resultados sugieren que mTORC2 no sería el complejo implicado en la regulación del canal.

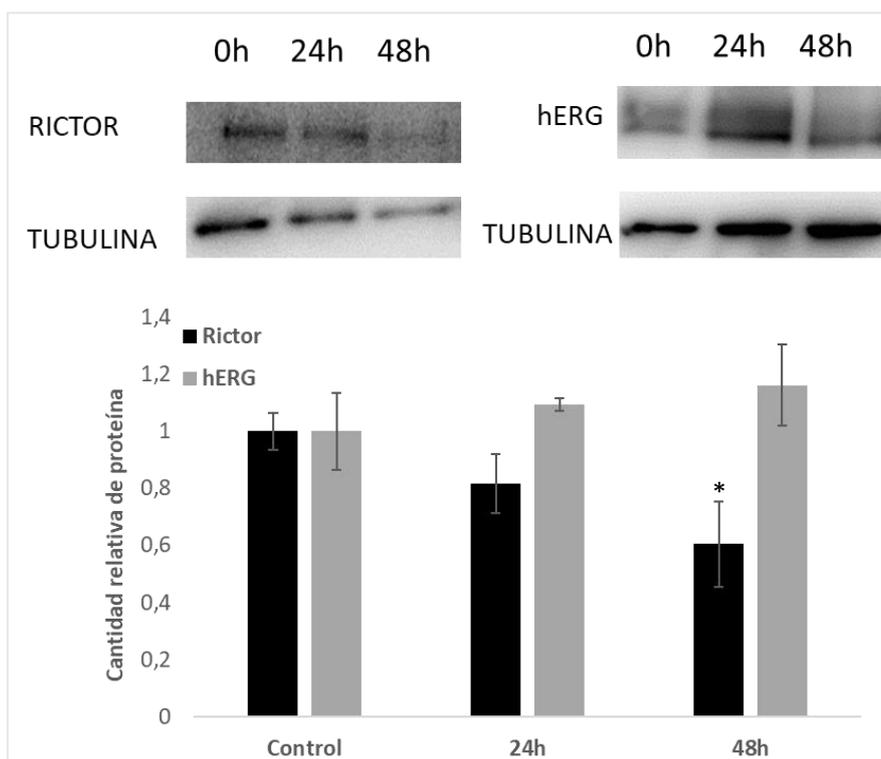


Figura 63. Efecto del silenciamiento de Rictor en la expresión de Rictor y canales hERG. Efecto del siRNA en la expresión de rictor y hERG en células control y en células incubadas durante 24 y 48h con 2 µg de siRNA. Resultados de western blot (arriba) y grafico de intensidad de las bandas (abajo) obtenida a través de image J. Las bandas fueron normalizadas usando Tubulina. * $p < 0.05$. Control, siRICTOR 24h, siRNA 48h N= 4.

5.2 El silenciamiento de Rictor no altera la densidad de corriente hERG

Asimismo, realizamos registros de corriente hERG en células control y tras el silenciamiento con siRICTOR durante 48h. Como muestra la curva corriente-voltaje (Figura 64), no se observaron cambios significativos en la densidad de IhERG a ninguno de los voltajes testados.

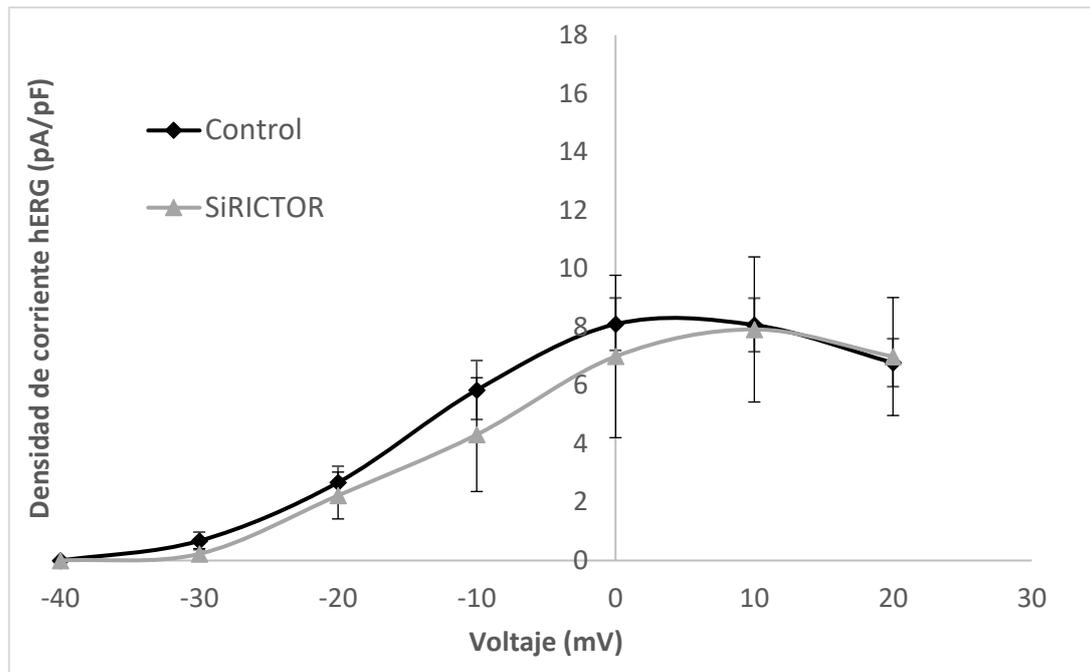


Figura 64. Efecto del silenciamiento de Rictor en la densidad de corriente hERG. Densidad de corriente hERG en células control (sin siRNA) y en células recogidas a las 48 h del silenciamiento del Rictor. Control N=11; siRNA 48h N=10.

5.3 siRICTOR combinado con Rapamicina en concentración baja no aumentaron la corriente hERG

El hecho de que el silenciamiento de Rictor no produjera un aumento en la corriente hERG ni en la expresión del canal podría deberse a que la inhibición de mTORC2 que se consigue es insuficiente. Hay que recordar que mTOR es una quinasa que se encuentra constitutivamente activa en condiciones fisiológicas y que el silenciamiento solo reduce un 40% el inmunomarcado de Rictor. Por lo tanto, para aumentar la inhibición de este complejo, se realizaron experimentos que combinaban el silenciamiento de Rictor con el tratamiento con Rapamicina. Las células HEK-hERG se incubaron con siRICTOR durante 24h y a las 24h se añadió a la placa Rapamicina a concentración 0.05 o 5 μ M. Pasadas otras 24h se realizaron registros de corriente hERG y se obtuvieron las respectivas curvas densidad de corriente-voltaje (Figura 65). Los resultados mostraron que la incubación con Rapamicina, especialmente a la concentración más alta (5 μ M) aumentó la I_{hERG} respecto al grupo control.

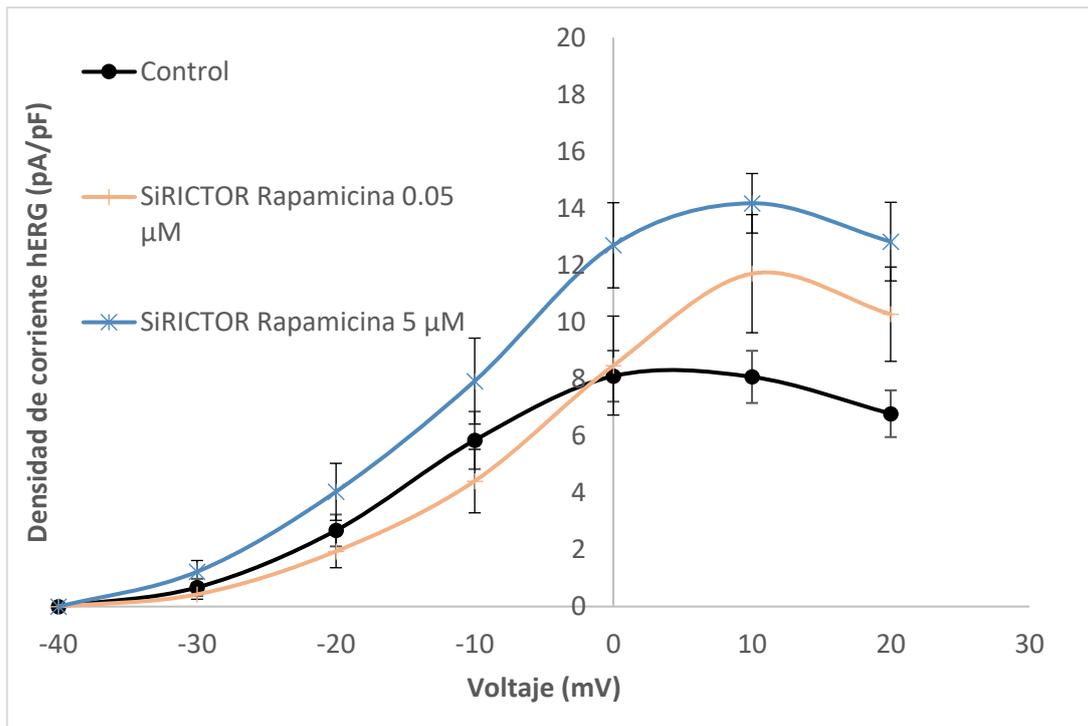


Figura 65. Efecto del silenciamiento de Rictor combinado con Rapamicina en la densidad de corriente hERG. Densidad de corriente hERG en células control y en células incubadas con Rapamicina a diferentes concentraciones durante 24h después del silenciamiento de Rictor. Control N=11; siRICTOR Rapamicina 0.05 μM N= 10; siRICTOR Rapamicina 5 μM N=11.

Al analizar la densidad de corriente hERG a +10 mV, observamos un aumento significativo respecto al grupo control del 45 y 76% en los grupos de SiRICTOR incubados con Rapamicina 0.05 y 5 μM respectivamente (Figura 66).

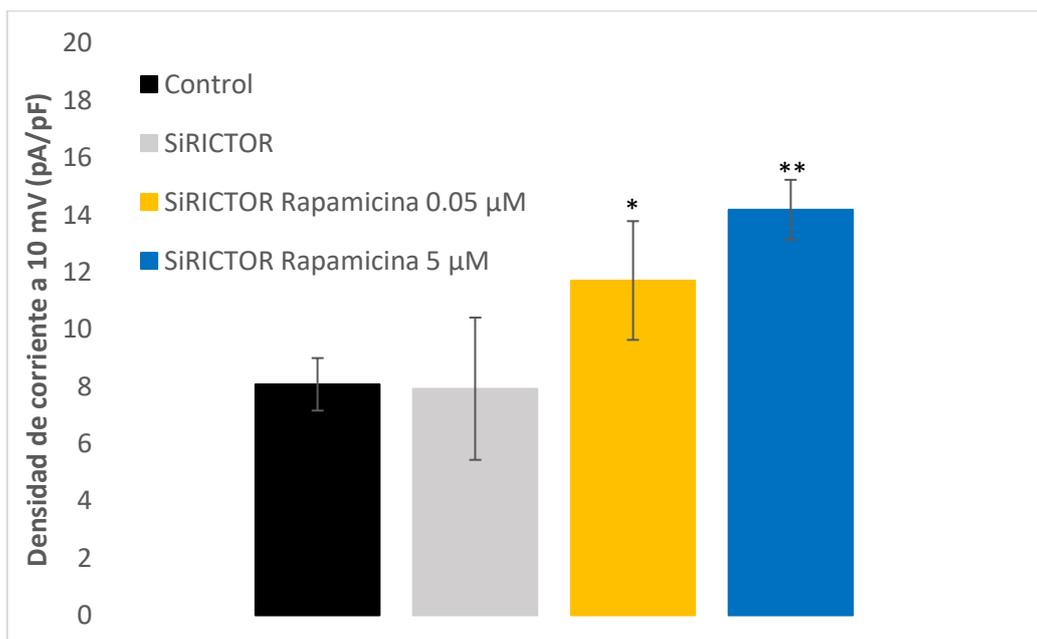


Figura 66. Efecto del silenciamiento de Rictor combinado con Rapamicina en la densidad de corriente hERG a +10 mV. Densidad de corriente hERG a +10 mV en células control y en células a las 48h de silenciamiento de Rictor incubadas durante 24h con Rapamicina a distintas concentraciones.*p<0.05, **p<0.01. Control N=11; SiRICTOR Rapamicina 0.05 μ M N=10; SiRICTOR Rapamicina 5 μ M 5 μ M N=11.

5.4 La incubación durante 24h con JRAB2011 3 μ M no tiene efecto sobre la densidad de corriente hERG.

Otra forma de valorar si el complejo mTOR implicado es mTORC1 o mTORC2 es recurrir a inhibidores químicos selectivos. En este sentido, JRAB2011 es inhibidor específico de mTORC2 porque actúa inhibiendo la unión entre Rictor y mTOR. Por lo tanto, incubamos células HeK293-hERG con con JRAB2011 3 μ M durante 24h o sin nada como grupo control y realizamos registros de I_{hERG} (Figura 67). La densidad de corriente hERG fue similar en el grupo control y en las células incubadas con JRAB2011. Estos resultados confirman que la inhibición de mTORC2 no afecta al funcionamiento del canal.

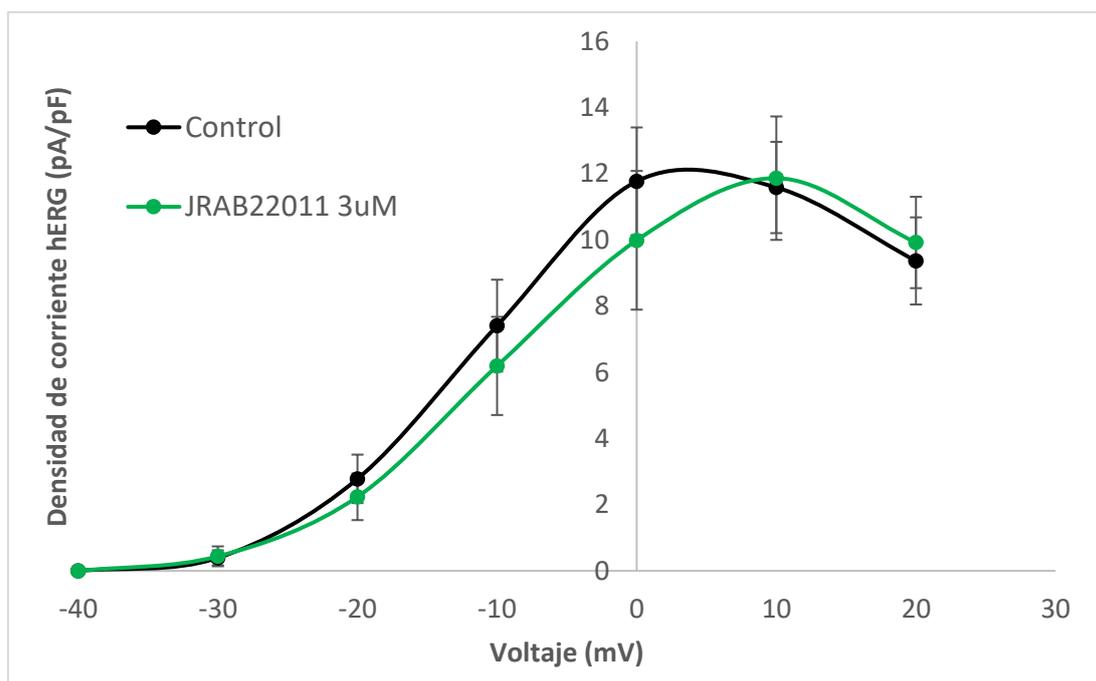


Figura 67. Efecto del JRAB2011 en la densidad de corriente hERG. Densidad de corriente I_{hERG} a diferentes voltajes en células control e incubadas durante 24h con JRAB2011 3 μ M. Control: N=14; JRAB2011 3 μ M N=10

5.5. El silenciamiento de Raptor no aumentó la expresión del canal hERG

Igual que para el silenciamiento de Rictor, también realizamos experimentos de puesta a punto para el silenciamiento de Raptor. Incubamos las células con 2 μg de siRAPTOR durante 24, 48 y 72h o con lipofectamina como control y analizamos la expresión de Raptor mediante inmunomarcaje (Figura 68). De nuevo, los resultados a las 48h mostraron una reducción del 39%, significativa respecto a control, que comenzaba a revertirse a las 72h. Sin embargo tampoco se observaron aumentos significativos en la expresión del canal hERG a ninguno de los tiempos de silenciamiento testados.

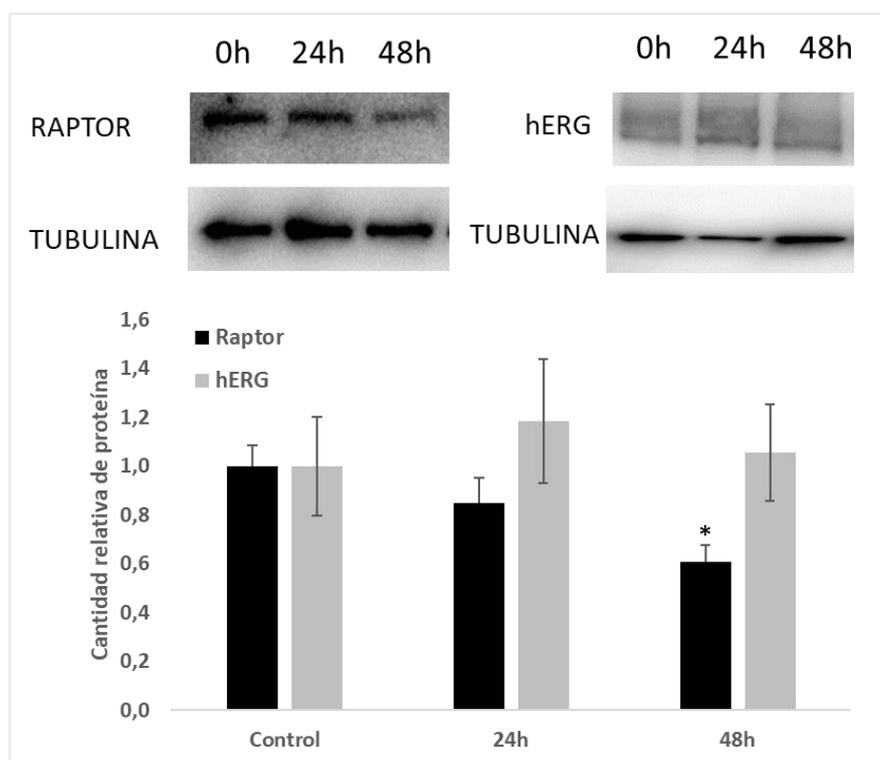


Figura 68. Efecto del silenciamiento de Raptor en la expresión de Raptor y canales hERG

Efecto del siRNA en la expresión de rictor y hERG en condiciones control y en células incubadas durante 24 y 48h con 2 μg de siRAPTOR. Resultados de western blot (arriba) y grafico de intensidad de las bandas (abajo) obtenida a través de image J. Las bandas fueron normalizadas usando Tubulina. * $p < 0.05$. Control, siRICTOR 24h, siRNA 48h N= 4.

5.6. El silenciamiento de Raptor no alteró la densidad de corriente hERG

Se realizaron registros de la corriente I_{hERG} en células control y en células con Raptor silenciado a las 48h. Al igual que con Rictor los resultados muestran que el silenciamiento de Raptor por sí solo no fue capaz de provocar ninguna diferencia significativa en la densidad de corriente respecto al grupo control (Figura 69).

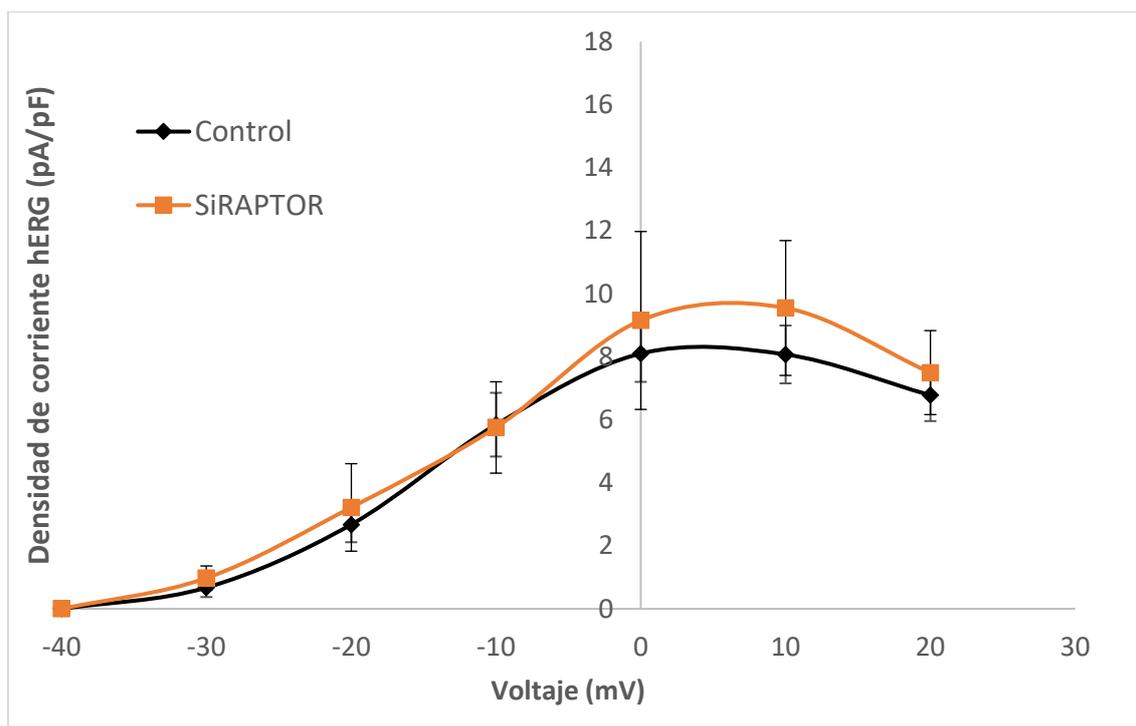


Figura 69. Efecto del silenciamiento de Raptor en la densidad de corriente hERG. Densidad de corriente hERG en células control (sin siRNA) y en células recogidas a las 48h del silenciamiento de Raptor. Control N=11; siRNA 48h N=10.

5.7. siRaptor combinado con Rapamicina en concentración baja aumentaron la corriente hERG

Los siguientes experimentos consistieron en complementar el silenciamiento de Raptor con el tratamiento con Rapamicina con el fin de lograr una mayor inhibición del complejo mTORC1. Para ello, tratamos a las células con siRaptor; 24h después añadimos Rapamicina a las concentraciones

habituales de 0.05 y 5 μM ; y 24h después recogimos las células para realizar los experimentos de electrofisiología.

Como se puede observar en la Figura 70, la densidad de I_{hERG} es mayor en los grupos experimentales de silenciamiento de Raptor más Rapamicina, que en el grupo control. A diferencia de lo que sucedía en el silenciamiento de Rictor, en estos experimentos el efecto máximo sobre la corriente se obtuvo con la concentración más baja de Rapamicina, la de 0,05 μM .

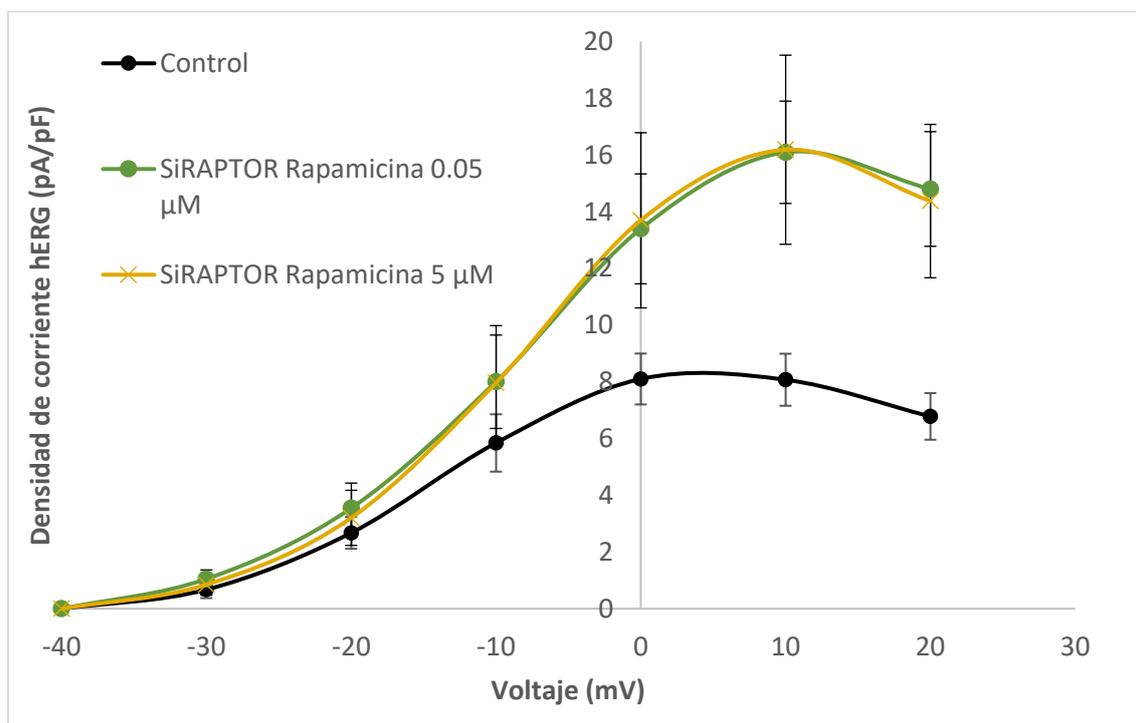


Figura 70. Efecto del silenciamiento de Raptor combinado con Rapamicina en la densidad de corriente I_{hERG} . Densidad de corriente I_{hERG} en células control y en células incubadas con Rapamicina durante 24h después del silenciamiento de Raptor e incubadas otras 24 horas con rapamicina a diferentes concentraciones. Control N=11; siRCTOR Rapamicina 0.05 μM N= 12; siRCTOR Rapamicina 5 μM N=13.

En el análisis de la densidad de corriente a +10 mV (Figura 71), se observó un aumento del 100%, significativo respecto al grupo control, en los grupos de siRCTOR incubados con Rapamicina tanto a concentración de 0.05 como de 5 μM . Es interesante señalar que ese aumento de la corriente es además muy similar al producido por la concentración más alta de rapamicina en células no silenciadas, que es del 112% (Figura 49).

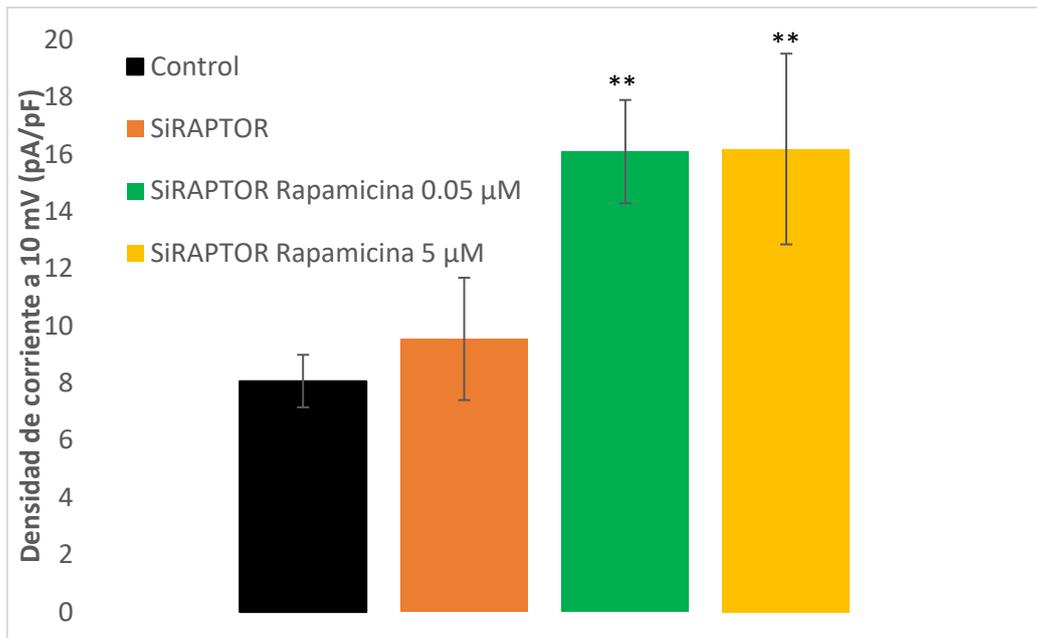


Figura 71. Efecto del silenciamiento de Raptor combinado con la Rapamicina en la densidad de corriente hERG a +10 mV. Densidad de corriente hERG a +10 mV en células control y en células a las 48h de silenciamiento de Raptor incubadas durante 24h con Rapamicina a distintas concentraciones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Control N=11; SiRaptor Rapamicina 0.05 μM N=12; SiRaptor Rapamicina 5 μM N=13.

En conjunto, estos resultados apuntan a que el responsable de los efectos en el funcionamiento del canal hERG observados es mTORC1.

6. La inhibición de mTOR también aumentó la corriente

I_{Kur}

Finalmente, nos preguntamos si mTOR podría estar regulando otros canales de potasio cardíacos además de hERG. Nos centramos en la principal corriente repolarizante en aurícula, la corriente ultrarrápida de potasio o I_{Kur} , que es conducida por el canal Kv1.5. El estudio de esta corriente se realizó utilizando la línea celular HL-1 ya que se trata de células auriculares de ratón. En esta última serie de experimentos, las células HL-1 se incubaron con Rapamicina 0,5 y 5 μM durante 24h y se registró la I_{Kur} . Los registros de I_{Kur} mostraron que,

respecto al grupo control, la incubación con Rapamicina aumentó la amplitud de corriente ultrarrápida de manera dependiente de concentración (Figura 72).

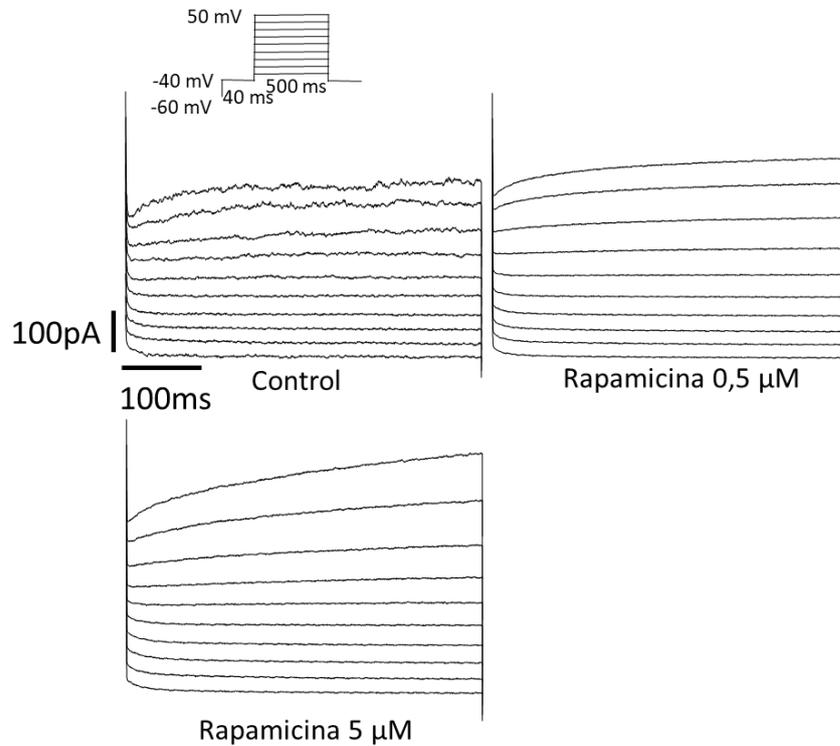


Figura 72. Efecto de la Rapamicina en la corriente I_{Kur} . Registros representativos de células HL-1 control e incubadas durante 24h con diferentes concentraciones de Rapamicina. El esquema de la parte superior describe el protocolo de registro.

Además, los resultados de densidad de I_{Kur} mostraron que, respecto al grupo control, la incubación con Rapamicina aumentó la densidad de corriente ultrarrápida de manera dependiente de concentración (Figura 73).

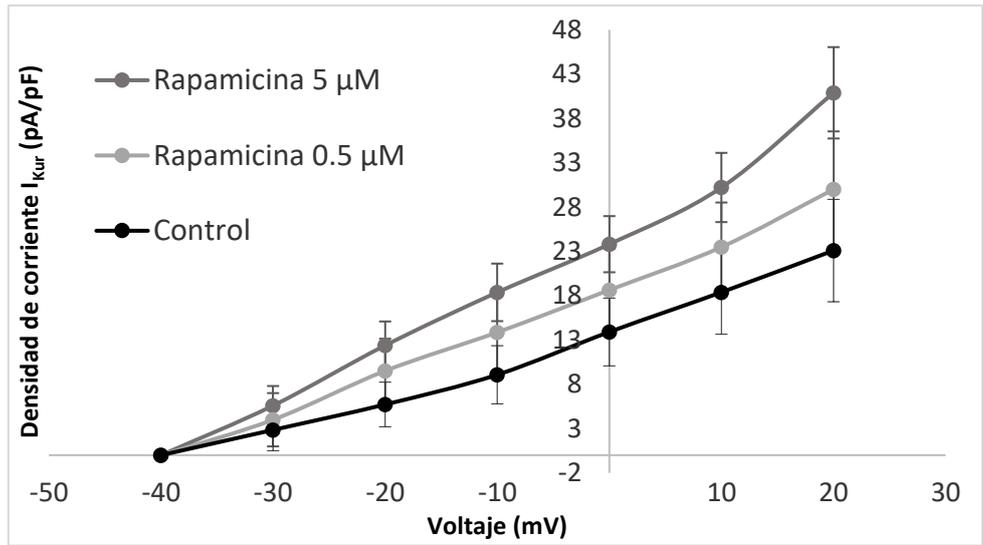


Figura 73. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente I_{Kur} . Densidad de corriente I_{Kur} a diferentes voltajes en células control e incubadas con Rapamicina a diferentes concentraciones. Control N=7; Rapamicina 0.05 μ M; Rapamicina 5 μ M N=10.

En la I_{Kur} , la densidad de corriente máxima se alcanza a +20 mV (Figura 74). Se observó un aumento significativo de la densidad de corriente respecto a control en células incubadas durante 24h con la concentración más alta de Rapamicina (5 μ M).

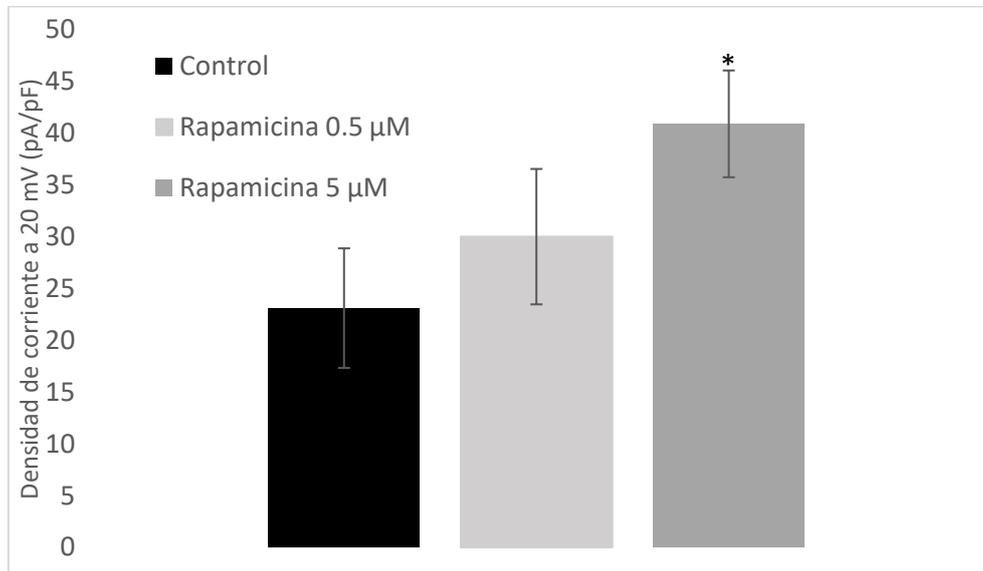


Figura 74. Efecto de la Rapamicina en la densidad de corriente I_{Kur} a +20 mV. Densidad de corriente I_{Kur} a +20 mV en células control e incubadas con distintas concentraciones de Rapamicina. * $p < 0.05$. Control: N=7; Rap0,5 y Rap5: N=10.

Por lo tanto, mTOR no regula exclusivamente al canal hERG. La inhibición de mTOR mediante Rapamicina también aumenta la corriente ultrarrápida de potasio.

DISCUSIÓN

1. La inhibición prolongada de mTOR aumenta la corriente hERG

El principal resultado de esta Tesis Doctoral es que la inhibición de mTOR durante 24h con Rapamicina aumentó significativamente la I_{hERG} ya que las células HEK-hERG tratadas con rapamicina tienen más corriente que las células control.

El siguiente paso fue esclarecer cual podría ser el mecanismo por el cual la inhibición de mTOR produce ese aumento en la corriente. Para ello, se midieron otros parámetros biofísicos del canal: el voltaje medio de activación (V_{half}), la constante de tiempo de deactivación (τ_{deact}) y el voltaje de inversión (V_{inv}) con el propósito de ver si estas también estaban alteradas y si podían explicar el efecto observado. Una disminución del V_{half} , en otras palabras, un desplazamiento del mismo hacia valores más negativos podría explicar un aumento de la corriente, ya que de esta manera habría más canales abiertos a voltajes más negativos. Este efecto es común en los facilitadores de hERG (Hosaka et al, 2007) o algunos activadores de tipo 2 como la Mallotoxina y KB130015 sustancias que provocan un desplazamiento a la izquierda de la curva de activación (Gessner et al, 2010; Zeng et al, 2006). Sin embargo, al no haber encontrado diferencias significativas no puede ser ese el mecanismo de acción de la rapamicina.

Otro mecanismo para producir un aumento de la corriente tiene que ver con la τ_{deact} . En este caso, una deactivación más lenta, es decir, una vuelta al estado de reposo más lenta, puede aumentar el tiempo durante el cual el canal permanece abierto y por tanto explicar el aumento de la corriente, característica propia de los activadores de tipo 1 (Perry et al, 2007; Kang et al, 2005). De nuevo, al igual que con el V_{half} , las células tratadas con Rapamicina no mostraron diferencias significativas en la τ_{deact} , por lo que no es este tampoco el mecanismo que explica el aumento de la corriente.

Hay otras moléculas que pueden aumentar la actividad del canal hERG mediante la unión directa con el canal como es el caso del Ethinylestradiol (EE2) (Tamura et al, 2020) aunque otros estrógenos han demostrado actuar como

bloqueantes (Salem 2018). Para confirmar que la Rapamicina no tiene los efectos de un activador convencional, es decir, que no hace su efecto mediante su unión con el canal, el siguiente paso fue testar si el efecto producido era independiente y específico de la propia Rapamicina sobre el canal. Se realizaron experimentos agudos en los que la Rapamicina se añade al momento de registrar. En este caso, se usó un protocolo en el que se aplicaba el mismo voltaje de manera constante a lo largo del tiempo. Si la Rapamicina estuviera uniéndose al canal y actuando como bloqueante se esperaría que la caída de la corriente fuera mayor debido a que un bloqueo no permitiría el paso de corriente. Si por el contrario la Rapamicina actuase como activador se observaría una caída más lenta. Durante los 35 minutos el “run down” de las células perfundidas con Rapamicina 5 μ M fue similar al de las células del grupo control perfundidas con DMSO (Figura 53). La Rapamicina no mostró ningún efecto de esta manera, por lo que no puede ser un efecto directo de la Rapamicina. En definitiva, parece que la Rapamicina no se comporta como otros activadores conocidos de la corriente hERG.

Seguidamente, quisimos descartar que la Rapamicina activase otras rutas de señalización a corto plazo que provoquen modificaciones postraduccionales del canal como su fosforilación, palmitoilación, etc... que pudieran ser responsables del efecto observado en la corriente. Para ello, se incubaron las células con la concentración más alta de Rapamicina durante 35 minutos previos al registro, tiempo suficiente para activar dichas vías. Tras otros 35 minutos de registro en presencia de Rapamicina, los resultados no mostraron diferencias significativas respecto a control, lo cual demostró que el aumento de la densidad de corriente observado no sucedía mediante vías de señalización “rápidas”.

Finalmente, quisimos confirmar que el efecto de la rapamicina se producía por la inhibición de mTOR, y no por un efecto directo, inespecífico o desconocido de la rapamicina. Para ello, utilizamos un inhibidor diferente de mTOR, la Torina-1. La incubación durante 24h con Torina-1 provocó el mismo efecto sobre la corriente hERG que la Rapamicina, lo que demuestra que el efecto se debe a la inhibición de mTOR.

A pesar de que nuestros resultados confirman un aumento de la corriente hERG en presencia de la Rapamicina, también puede hacer el efecto contrario en diferentes circunstancias. Un ejemplo de ello lo encontramos en modelos animales de poliposis adenomatosa, un tipo de cáncer colorectal producido por mutaciones en el adenomatous polyposis coli (APC) donde la vía de mTOR se encuentra sobreactivada. El uso de Rapamicina en este modelo animal demostró una reducción a nivel funcional y a nivel de mRNA en el canal epitelial de sodio (ENaC) y en los canales de potasio BK, Elk1 y Erg1 canales que se encontraban sobreactivados, al igual que mTOR (Koehl *et al*, 2010). También en el canal ENaC del tubo colector, otros grupos han encontrado que la delección de mTOR en modelos animales reduce tanto la actividad como la expresión de dichos canales afectando así a la homeostasis del sodio en el tubo colector y a la presión arterial (Chen *et al*, 2022).

2. La inhibición prolongada de mTOR aumenta la traducción y el tráfico a membrana del canal hERG

Una vez descartado que la Rapamicina actúa uniéndose al canal hERG, se realizaron diferentes experimentos relacionados con la expresión del canal, ya que el aumento de la densidad de corriente podía estar siendo causado por un aumento de la cantidad de canal.

El primer paso consistió en realizar western blot para comparar la cantidad de canal de células control y células tratadas con rapamicina. Como esperábamos, las células tratadas con Rapamicina durante 24 horas mostraron mayor cantidad de canal que las células control. Al mismo tiempo, testamos si la Rapamicina modifica el tráfico de canal hERG a la membrana comparando la cantidad del canal hERG glicosilado, que corresponde a la forma madura del canal que se expresa principalmente en la membrana respecto a la cantidad total del canal (Smith *et al.*, 2016). Así, observamos que la concentración más alta de Rapamicina aumenta de la cantidad de canal glicosilado, y por lo tanto en membrana, de manera significativa. Una diferencia que se pudo observar frente al Patch-Clamp, es que en el blot únicamente la concentración más alta mostró diferencias significativas mientras que a nivel de registro las diferencias pueden

observarse a concentraciones más bajas. El motivo de esta diferencia pudo ser simplemente que el Patch-Clamp es una técnica más sensible que el Western Blot. Efectos parecidos a los de la rapamicina en el aumento de corriente mediante aumento del trafficking se han observado con ligandos del receptor Sigma-1 del retículo endoplasmico. Esos ligandos fueron capaces de aumentar la corriente mediante el aumento del trafficking a membrana de subunidades del canal hERG (Crottés *et al*, 2021).

Visto que las células tratadas con Rapamicina mostraron una mayor cantidad de canal el siguiente paso fue buscar un mecanismo. Se tuvieron en cuenta varias opciones: que el aumento de la cantidad de canal fuera consecuencia de un aumento de la expresión del mRNA que codifica el canal hERG, que la Rapamicina actuase sobre la síntesis o degradación del canal o ambas.

Para comprobar si el efecto de la inhibición de mTOR tenía lugar a nivel de la transcripción del gen se realizó una PCR a tiempo real (RT-PCR). Mediante esta técnica es posible cuantificar la cantidad de mRNA. Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones de Rapamicina fue capaz de aumentar la cantidad de mRNA, por lo tanto, el aumento de canal hERG no era causado por un aumento de la transcripción genética.

Otra posibilidad era que la cantidad del canal hERG estuviera aumentada tras la inhibición de mTOR porque se produjera una reducción de su degradación. Para testar esta hipótesis, aplicamos rapamicina a un grupo de células en las que se había inhibido el proteasoma, y el efecto observado fue también un aumento de la cantidad de canal. Por lo tanto el correcto funcionamiento del proteasoma no es necesario para que la inhibición de mTOR incremente la expresión de hERG. Finalmente, en otro grupo de experimentos exploramos el efecto de la Rapamicina en células en las que se había inhibido la síntesis de proteína y observamos que la inhibición de mTOR no era capaz de aumentar la cantidad de canal hERG en células a las que se había inhibido su capacidad de traducir el mRNA. Este experimento demostró que la inhibición de mTOR aumenta la cantidad de canal hERG porque aumenta la traducción de la proteína

Una de las funciones descritas del complejo mTORC1, es precisamente la regulación de la traducción, aumentándola cuando este está activo. Una razón por la que su inhibición aumenta la traducción del canal hERG reside precisamente en su función, ya que aumenta la traducción de proteínas pero principalmente de aquellas proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Sonenberg *et al*, 2009). En otras palabras, es posible que mTORC1 en condiciones normales aumente la traducción de proteínas metabólicas dándole prioridad frente a proteínas estructurales y otras proteínas no metabólicas, como es el caso de hERG, y que si mTORC1 está inhibido las proteínas no metabólicas tengan mayor peso a la hora de la traducción. Así, puede que la inhibición de mTOR promueva precisamente la traducción de esas proteínas.

Otros ensayos con Rapamicina han demostrado un aumento de canales iónicos de potasio, como es el caso del canal Kv1.1 en modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal donde la inhibición de mTOR aumentó la expresión del canal Kv1.1 (Sonsaya *et al*, 2015).

3. El responsable del aumento de hERG es el complejo mTORC1

En los experimentos mencionados hasta el momento, se han utilizado rapamicina y torina. La rapamicina es un inhibidor del complejo mTORC1. Pero, debemos tener en cuenta que las exposiciones prolongadas a Rapamicina son capaces de inhibir tanto a mTORC1 como a mTORC2 (Sarbasov *et al*, 2006). Por otro lado, la Torina-1 es un inhibidor de mTOR por lo que inhibe la función de ambos complejos. El siguiente paso fue confirmar cual de los dos complejos, si no los dos, era el causante del efecto observado. Con este objetivo se realizaron silenciamientos de las proteínas Raptor y Rictor, principales componentes de los complejos mTORC1 y mTORC2 respectivamente (Sarbasov *et al*, 2005). De este modo podíamos ver con mayor detalle el efecto de la inhibición de cada uno de ellos por separado.

Los experimentos de los silenciamientos no mostraron ningún efecto en la corriente hERG. En ambos silenciamientos se observó que las corrientes registradas no mostraban diferencias significativas respecto a control. Esto posiblemente se deba a que el complejo mTOR está constitutivamente activo, por lo cual, un silenciamiento del 40% de Raptor y Rictor no son suficientes para producir un efecto en la expresión del canal. Sin embargo, añadir Rapamicina a los experimentos mostró resultados interesantes a la hora de elegir a uno de los dos complejos como responsable del aumento de la densidad de corriente.

En estos experimentos, se usaron dos concentraciones de Rapamicina, 0.05 μM y 5 μM , la más baja y la más alta de las usadas en los primeros experimentos para comprobar si el hecho de que los complejos estuvieran parcialmente inhibidos, facilitaba el trabajo de la Rapamicina, y en caso de ser así, ver con cuál de los silenciamientos la Rapamicina hacía un mayor efecto. Los resultados mostraron que solo el silenciamiento de Raptor conseguía el mismo aumento con las dos concentraciones. Este resultado muestra que el silenciamiento parcial de Raptor junto con la concentración baja de Rapamicina conseguía reproducir de manera prácticamente igual el aumento de densidad de corriente que producía la concentración más alta de Rapamicina. Que los efectos del silenciamiento de raptor y los de la rapamicina sean aditivos implica que ambos actúan a través de la misma vía de señalización. Es decir, la Rapamicina actúa sobre la expresión de hERG inhibiendo mTORC1. Para confirmar este resultado, utilizamos un inhibidor específico de mTORC2, con el que no vimos ningún efecto sobre la expresión del canal.

En resumen, con el complejo mTORC2 parcialmente inhibido es necesaria la misma cantidad de Rapamicina para obtener el mismo efecto que en condiciones control, y la inhibición específica de mTORC2 no produce ningún efecto sobre la expresión del canal. Por el contrario, cuando el complejo mTORC1 está inhibido en un 40%, una concentración de Rapamicina 100 veces menor hace el mismo efecto sobre la expresión del canal que la concentración máxima en condiciones control. Es decir, el aumento de la expresión del canal hERG está mediado a través de mTOR-C1 (Figura 75). Sin embargo, también hay trabajos en los que mTORC2 regula la función de canales iónicos. Como es

el caso de la regulación de los canales de sodio epiteliales. mTORC2 regula estos canales mediante la fosforilación de la enzima SGK-1 (Lu *et al*, 2011).

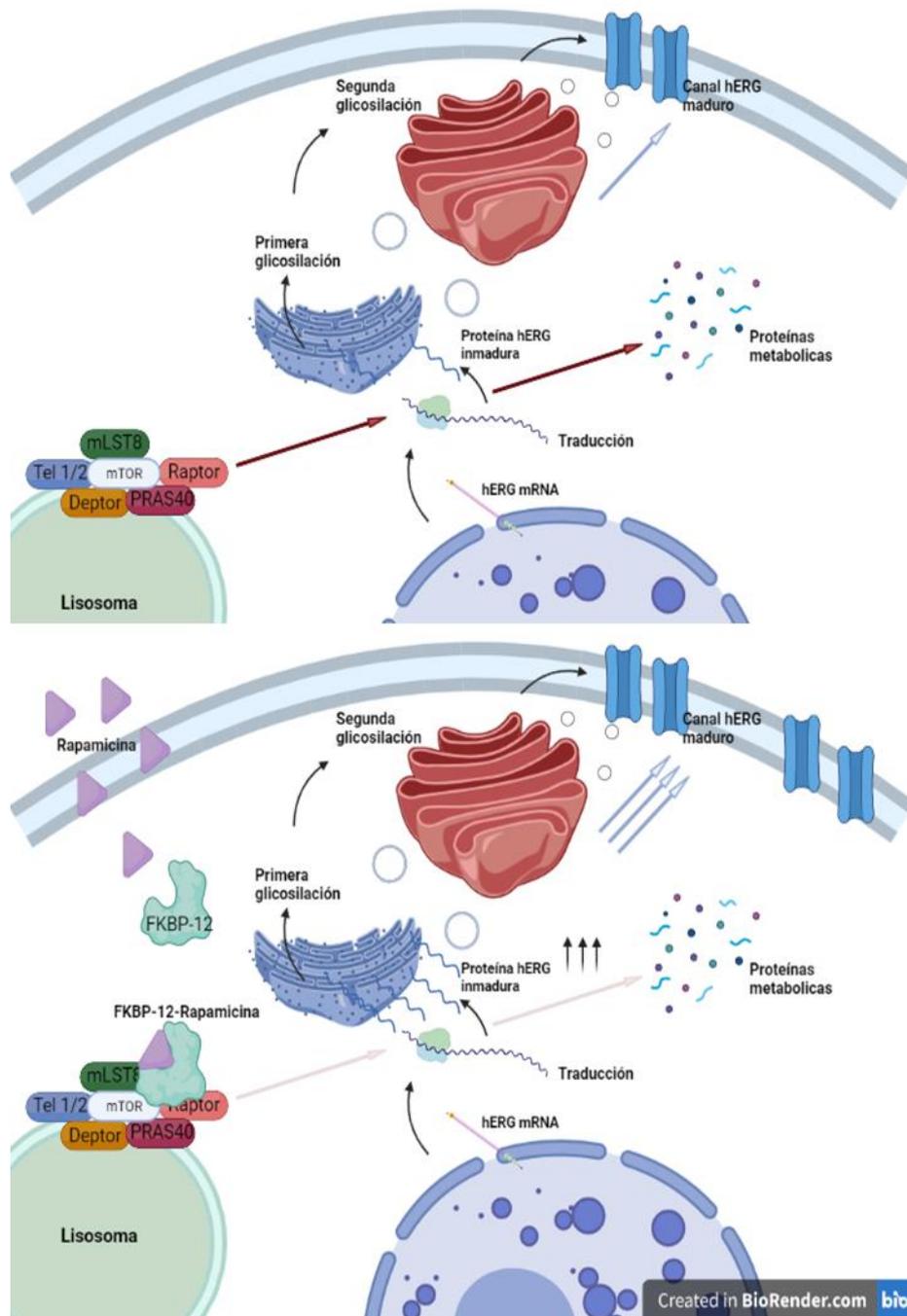


Figura 75. mTORC1 regula la expresión del canal hERG. Regulación de la síntesis del canal hERG mediante la inhibición de mTORC1. Arriba se muestran condiciones control en las que mTORC1 está activo. En esas condiciones mTORC1 está regulando la síntesis de proteínas relacionadas con el metabolismo. Abajo, la unión de la Rapamicina con la proteína FKBP-12 inhibe el complejo mTORC1 uniéndose a él. De esa manera se deja de dar prioridad a la síntesis de proteínas metabólicas y la síntesis de proteínas como el canal hERG aumenta, junto con un aumento del tráfico a membrana.

4. La regulación por parte de mTOR no es específica del canal hERG

A raíz de los resultados obtenidos la siguiente pregunta que surgió fue si este efecto de la inhibición de mTOR era exclusivo sobre la corriente hERG, principal corriente repolarizante ventricular en humanos, o si por el contrario también podía ser observado en otras corrientes.

Uno de los primeros candidatos fue la corriente de potasio ultrarrápida de salida (I_{Kur}), la principal corriente repolarizante auricular. Al igual que en la corriente hERG, las células tratadas con Rapamicina durante 24h mostraron un aumento de corriente respecto a control, siendo significativo con la concentración más alta. Estos resultados confirman que la inhibición de mTOR produce un aumento de la densidad de corriente I_{Kur} , efecto que podría darse en otras corrientes cardíacas. A pesar de ser preliminares, estos resultados muestran que la inhibición de mTOR es una estrategia interesante para la regulación de expresión de canales iónicos y de corrientes iónicas y podría abrir la puerta al tratamiento de enfermedades en las que las corrientes están reducidas, como es el caso del síndrome de QT largo (LQTS) tipo 2 en la que la corriente hERG está reducida (Smith *et al*, 2016).

Como se ha dicho anteriormente, la inhibición de mTOR mediante Rapamicina es capaz de aumentar la expresión del Kv1.1 en epilepsia (Sonsaya *et al*, 2015). Además en canales lisosomales, necesarios para la función de la autofagia se ha observado que la inhibición de mTOR aumenta la activación de dichos canales (Li *et al*, 2019; Cang *et al*, 2013) Por otro lado, también en epilepsia, inhibir a mTOR puede mejorar el estado de los pacientes reduciendo tanto la actividad como la expresión de algunos de los canales relacionados con la enfermedad (Hodges 2020; Pernice *et al*, 2016; Wong, 2012) La relación de mTOR con los canales iónicos se ha podido ver incluso en canales activados mecánicamente. Un ejemplo de ello es la sobreactivación del canal piezo1 por mTOR en cáncer de próstata (Han *et al*, 2019).

CONCLUSIONES

1. La inhibición del complejo mTOR aumenta la densidad de corriente hERG.
2. El aumento de la densidad de corriente hERG tras la inhibición de mTOR no se produce por un cambio en las propiedades biofísicas del canal ni por la unión directa del inhibidor al canal hERG.
3. El aumento de la densidad de corriente no se debe a un efecto a corto plazo de la Rapamicina, es decir, no se debe a la activación de otros mensajeros secundarios celulares.
4. La inhibición de mTOR produce un aumento de la expresión del canal hERG y de su tráfico a la membrana.
5. El aumento de la expresión del canal no se produce mediante un aumento en la transcripción del canal, sino que es un aumento en la traducción de proteínas la que produce el aumento.
6. El responsable de los efectos sobre el canal, y por tanto sobre la corriente hERG, se producen vía el complejo mTORC1.
7. El aumento de la densidad de corriente no es específico del canal hERG, sino que también se produce el mismo efecto sobre la I_{Kur} , la principal corriente responsable de la repolarización auricular.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, H., Fernández-Ruocco, J., Gallego, M., Malagueta-Vieira, L. L., Rodríguez-de-Yurre, A., Medei, E., & Casis, O. (2015). Thyroid stimulating hormone directly modulates cardiac electrical activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 89(Pt B), 280-286. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.019
- Aoyama, T., Matsui, T., Novikov, M., Park, J., Hemmings, B., & Rosenzweig, A. (2005). Serum and glucocorticoid-responsive kinase-1 regulates cardiomyocyte survival and hypertrophic response. *Circulation*, 111(13), 1652-1659. doi:10.1161/01.CIR.0000160352.58142.06
- Aparicio, J. F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S. F., Ee Khaw, L., . . . Leadlay, P. F. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *streptomyces hygroscopicus*: Analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase Elsevier BV. doi:10.1016/0378-1119(95)00800-4
- Arif, A., Terenzi, F., Potdar, A. A., Jia, J., Sacks, J., China, A., . . . Fox, P. L. (2017). EPRS is a critical mTORC1–S6K1 effector that influences adiposity in mice Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/nature21380
- Aylett, C. H. S., Sauer, E., Imseng, S., Boehringer, D., Hall, M. N., Ban, N., & Maier, T. (2016). Architecture of human mTOR complex 1. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 351(6268), 48-52. doi:10.1126/science.aaa3870
- Bae-Jump, V. L., Zhou, C., Boggess, J. F., & Gehrig, P. A. (2009). Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells. *Cancer*, 115(17), 3887-3896. doi:10.1002/cncr.24431
- Barros F, de la Peña P, Domínguez P, Sierra LM, Pardo LA. (2020). The EAG Voltage-Dependent K⁺ Channel Subfamily: Similarities and Differences in Structural Organization and Gating. *Front Pharmacol*,11:411. doi: 10.3389/fphar.2020.00411.
- Barros F, Pardo LA, Domínguez P, Sierra LM, de la Peña P. (2019). New Structures and Gating of Voltage-Dependent Potassium (Kv) Channels and Their Relatives: A Multi-Domain and Dynamic Question. *Int J Mol Sci*, 20(2):248. doi: 10.3390/ijms20020248.

- Bastidas, R. J., Shertz, C. A., Lee, S. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2012). Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of TOR. *Eukaryotic Cell*, 11(3), 270-281. doi:10.1128/EC.05284-11
- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555-592. doi:10.1152/physrev.2000.80.2.555
- Butler, A., Helliwell, M. V., Zhang, Y., Hancox, J. C., & Dempsey, C. E. (2019). An update on the structure of hERG. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1572. doi:10.3389/fphar.2019.01572
- Cang, C., Zhou, Y., Navarro, B., Seo, Y., Aranda, K., Shi, L., . . . Ren, D. (2013). mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na⁺ channels to adapt to metabolic state. *Cell*, 152(4), 778-790. doi:10.1016/j.cell.2013.01.023
- Casis, O., Olesen, S., & Sanguinetti, M. C. (2006a). Mechanism of action of a novel human ether-a-go-go-related gene channel activator. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 658-665. doi:10.1124/mol.105.019943
- Casis, O., Olesen, S., & Sanguinetti, M. C. (2006b). Mechanism of action of a novel human ether-a-go-go-related gene channel activator. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 658-665. doi:10.1124/mol.105.019943
- Catterall, W. A., Lenaeus, M. J., & Gamal El-Din, T. M. (2019). Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-
- Chapman, H., Ramström, C., Korhonen, L., Laine, M., Wann, K.T., Lindholm, D., Pasternack, M., Törnquist, K. (2005). Downregulation of the HERG (KCNH2) K⁺ channel by ceramide: evidence for ubiquitin-mediated lysosomal degradation. *J. Cell Sci.* 118, 5325–5334.
- Chiamvimonvat, N., Ye Chen-Izu, J., Clancy, C. E., Deschenes, I., Dobrev, D., Heijman, J., . . . Nerbonne, J. M. (2017). Potassium currents in the heart: Functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *The Journal of Physiology*, 595(7), 2229-2252. doi:10.1113/JP272883

- Chen B, Fluit M B., Brown A L., Scott S, Gadicherla A, Ecelbarger C M. (2022). Selective Deletion of the Mechanistic Target of Rapamycin From the Renal Collecting Duct Principal Cell in Mice Down-Regulates the Epithelial Sodium Channel. *Frontiers in Physiology*, 12, 1664-1679 doi:10.3389/fphys.2021.787521
- Choi, S. W., Choi, S. W., Jeon, Y. K., Moon, S., Zhang, Y., & Kim, S. J. (2018). Suppression of hERG K⁺ current and cardiac action potential prolongation by 4-hydroxynonenal via dual mechanisms. *Redox Biology*, 19, 190-199. doi:10.1016/j.redox.2018.08.018
- Clauson P.G., Brismar K., Hall K., Linnarsson R., Grill V. (1998). Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 in a representative population of type 2 diabetic patients in sweden. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 58(4), 353-360. doi:10.1080/00365519850186544
- Crottès, D., Martial, S., Rapetti-Mauss, R., Pisani, D. F., Loriol, C., Pellissier, B., . . . Soriani, O. (2011). Sig1R protein regulates hERG channel expression through a post-translational mechanism in leukemic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 27947-27958. doi:10.1074/jbc.M111.226738
- Cruz, M. C., Cavallo, L. M., Görlach, J. M., Cox, G., Perfect, J. R., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (1999). Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with FKBP12 and TOR kinase homologs in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(6), 4101-4112. doi:10.1128/MCB.19.6.4101
- Cui, J., Kagan, A., Qin, D., Mathew, J., Melman, Y. F., & McDonald, T. V. (2001). Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17244-17251. doi:10.1074/jbc.M010904200
- Cunningham, J. T., Mootha, V. K., Puigserver, P., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., & Vazquez, F. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 transcriptional complex. *Nature (London)*, 450(7170), 736-740. doi:10.1038/nature06322

- Du, L., Li, M., & You, Q. (2009). The interactions between hERG potassium channel and blockers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(4), 330-338. doi:10.2174/156802609788317829
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., . . . Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*, 39(2), 171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., . . . Taylor, R. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 331(6016), 456-461. doi:10.1126/science.1196371
- Eng, C. P., Sehgal, S. N., & Vezina, C. (1984). Activity of rapamycin (ay-22, 989) against transplanted tumors. *Journal of Antibiotics*, 37(10), 1231-1237. doi:10.7164/antibiotics.37.1231
- Ezzat, V. A., Duncan, E. R., Wheatcroft, S. B., & Kearney, M. T. (2008). The role of IGF-I and its binding proteins in the development of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 10(3), 198-211. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00709.x
- Fernández-Mariño, A.I., Harpole, T.J., Oelstrom, K. et al. (2018). Gating interaction maps reveal a noncanonical electromechanical coupling mode in the Shaker K⁺ channel. *Nat Struct Mol Biol* 25, 320–326 doi: 10.1038/s41594-018-0047-3
- Fernández-Trillo J, Barros F, Machín A, Carretero L, Domínguez P, de la Peña P. Molecular determinants of interactions between the N-terminal domain and the transmembrane core that modulate hERG K⁺ channel gating. (2011). *PLoS One*. 6(9):e24674. doi: 10.1371/journal.pone.0024674. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21935437; PMCID: PMC3174182.
- Ficker, E., Dennis, A.T., Wang,L., Brown, A.M. (2003). Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel hERG. *Circ. Res.*92,e87–e100

- Foo, B., Williamson, B., Young, J. C., Lukacs, G., & Shrier, A. (2016). hERG quality control and the long QT syndrome. *The Journal of Physiology*, 594(9), 2469-2481. doi:10.1113/JP270531
- French R.J, and Zamponi G. W., (2005). Voltage-gated sodium and calcium channels in nerve, muscle, and heart. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, vol. 4, no. 1, pp. 58-69, March 2005, doi: 10.1109/TNB.2004.842500
- Fu, W., & Hall, M. N. (2020). Regulation of mTORC2 signaling MDPI AG. doi:10.3390/genes11091045
- Gallego, M., Setién, R., Izquierdo, M. J., Casis, O., & Casis, E. (2003). Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Res*. 52(6):735-41. PMID: 14640895.
- Gallego, M., Casis, E., Izquierdo, M. J., & Casis, O. (2000). Restoration of cardiac transient outward potassium current by norepinephrine in diabetic rats. *Pflügers Archiv*, 441(1), 102-107. doi:10.1007/s004240000374
- Gallego, M., & Casis, O. (2013). Cellular mechanism underlying the malfunction of cardiac ionic channels in diabetes Springer New York. doi:10.1007/978-1-4614-9317-4_11
- García-Martínez, J. M., & Alessi, D. R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochemical Journal*, 416(3), 375-385. doi:10.1042/BJ20081668
- Gessner, G., Macianskiene, R., Starkus, J. G., Schönherr, R., & Heinemann, S. H. (2010). The amiodarone derivative KB130015 activates hERG1 potassium channels via a novel mechanism. *European Journal of Pharmacology*, 632(1), 52-59. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.010
- Gong, Q., Keeney, D.R., Molinari, M., Zhou, Z., (2005). Degradation of trafficking-defective long QT syndrome type II mutant channels by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 19419–19425.

- Gómez-Hurtado, N., Fernández-Velasco, M., Fernández-Alfonso, M. S., Boscá, L., & Delgado, C. (2013). Prolonged leptin treatment increases transient outward K⁺ current via upregulation of Kv4.2 and Kv4.3 channel subunits in adult rat ventricular myocytes. *Pflügers Archiv*, 466(5), 903-914. doi:10.1007/s00424-013-1348-3
- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., . . . Latorre, R. (2012). K⁺ channels: Function-Structural overview. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/cphy.c110047 Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.c110047>
- Gregory, M. A., Petkovic, H., Lill, R. E., Moss, S. J., Wilkinson, B., Gaisser, S., . . . Sheridan, R. M. (2005). Mutasynthesis of rapamycin analogues through the manipulation of a gene governing starter unit biosynthesis. *Angewandte Chemie (International Ed.)*, 44(30), 4757-4760. doi:10.1002/anie.200462784
- Grizel, A. V., Glukhov, G. S., & Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Actanaturae*, 6(4), 10-26. doi:10.32607/20758251-2014-6-4-10-26
- Guan, K., Kim, J., Kundu, M., & Viollet, B. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132-141. doi:10.1038/ncb2152
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., . . . Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Developmental Cell*, 11(6), 859-871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007
- Hall, M. N., Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüeegg, M. A., & Hall, A. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1122-1128. doi:10.1038/ncb1183
- Han, L., Wu, J., & Yang, L. (2012). Effect of combination of rapamycin and cisplatin on human cervical carcinoma hela cells. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 16(6), 512-515. doi:10.5114/wo.2012.32483

- Han, Y., Liu, C., Zhang, D., Men, H., Huo, L., Geng, Q., . . . Jia, Z. (2019). Mechanosensitive ion channel Piezo1 promotes prostate cancer development through the activation of the akt/mTOR pathway and acceleration of cell cycle. *International Journal of Oncology*, 55(3), 629-644. doi:10.3892/ijco.2019.4839
- Harris, P. R. E. (2016). The normal electrocardiogram. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 28(3), 281-296. doi:10.1016/j.cnc.2016.04.002
- High, K. P., & Washburn, R. G. (1997). Invasive aspergillosis in mice immunosuppressed with cyclosporin A, tacrolimus (FK506), or sirolimus (rapamycin). *The Journal of Infectious Diseases*, 175(1), 222-225. doi:10.1093/infdis/175.1.222
- Hodges, S. L., & Lugo, J. N. (2020). Therapeutic role of targeting mTOR signaling and neuroinflammation in epilepsy. *Epilepsy Research*, 161, 106282. doi:10.1016/j.eplepsyres.2020.106282
- Horn, R., Ding, S., & Gruber, H. J. (2000). Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels. *The Journal of General Physiology*, 116(3), 461-476. doi:10.1085/jgp.116.3.461
- Horovitz, A., & Yifrach, O. (2000). On the relationship between the hill coefficients for steady-state and transient kinetic data: A criterion for concerted transitions in allosteric proteins. *Bulletin of Mathematical Biology*, 62(2), 241-246. doi:10.1006/bulm.1999.0150
- Hosaka, Y., Iwata, M., Kamiya, N., Yamada, M., Kinoshita, K., Fukunishi, Y., . . . Kurachi, Y. (2007). Mutational analysis of block and facilitation of HERG current by A class III anti-arrhythmic agent, nifekalant. *Channels (Austin, Tex.)*, 1(3), 198-208. doi:10.4161/chan.4691
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., . . . Schmid, S. L. (1981). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy doi:10.1091/mbc.E08

- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*, 17(15), 1829-1834. doi:10.1101/gad.1110003
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature (London)*, 423(6935), 33-41. doi:10.1038/nature01580
- Jiang, Q., Zheng, H., Liu, W., & Anderson, L. Y. (2011). Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nature Communications*, 2(1), 250. doi:10.1038/ncomms1254
- Jiménez-Vargas, J. M., Restano-Cassulini, R., & Possani, L. D. (2012). Toxin modulators and blockers of hERG K⁺ channels. *Toxicon (Oxford)*, 60(4), 492-501. doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.024
- Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., & Kaeberlein, M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature (London)*, 493(7432), 338-345. doi:10.1038/nature11861
- Kang, J., Chen, X., Wang, H., Ji, J., Cheng, H., Incardona, J., . . . Rampe, D. (2005). Discovery of a small molecule activator of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) cardiac K⁺ channel. *Molecular Pharmacology*, 67(3), 827-836. doi:10.1124/mol.104.006577
- Kim, D. M., & Nimigean, C. M. (2016). Voltage-gated potassium channels: A structural examination of selectivity and gating. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), a029231. doi:10.1101/cshperspect.a029231
- Kimura, K., & Huang, R. C. C. (2016). Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid broadly suppresses cancer metabolism and synergistically induces strong anticancer activity in combination with etoposide, rapamycin and UCN-01. *PloS One*, 11(2), e0148685. doi:10.1371/journal.pone.0148685
- Koehl, G. E., Spitzner, M., Ousingsawat, J., Schreiber, R., Geissler, E. K., & Kunzelmann, K. (2010). Rapamycin inhibits oncogenic intestinal ion channels and neoplasia in APC mice. *Oncogene*, 29(10), 1553-1560. doi:10.1038/onc.2009.435

- Krenz, W. C., Parker, A. R., Rodgers, E. W., & Baro, D. J. (2014). Dopaminergic tone persistently regulates voltage-gated ion current densities through the D1R-PKA axis, RNA polymerase II transcription, RNAi, mTORC1, and translation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 39. doi:10.3389/fncel.2014.00039
- Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 72(19), 3677-3693. doi:10.1007/s00018-015-1948-5
- Lamming, D. W. (2021). Rapamycin and rapalogs MDPI AG. doi:10.20944/preprints202102.0491.v1
- Lamothe, S. M., Hulbert, M., Guo, J., Li, W., Yang, T., & Zhang, S. (2018). Glycosylation stabilizes hERG channels on the plasma membrane by decreasing proteolytic susceptibility. *The FASEB Journal*, 32(4), 1933-1943. doi:10.1096/fj.201700832R
- Laplante, M., & Sabatini, D. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 8), 1713-1719. doi:10.1242/jcs.125773
- Lee, A., Scapa, E. F., Cohen, D. E., & Glimcher, L. H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, 320(5882), 1492-1496. doi:10.1126/science.1158042
- Lee, D., Kuo, H., Chen, C., Hsu, J., Chou, C., Wei, Y., . . . Hung, M. (2007). IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, 130(3), 440-455. doi:10.1016/j.cell.2007.05.058
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- Li, P., Gu, M., & Xu, H. (2019). Lysosomal ion channels as decoders of cellular signals. *Trends in Biochemical Sciences (Amsterdam. Regular Ed.)*, 44(2), 110-124. doi:10.1016/j.tibs.2018.10.006

- Lörinczi É, Gómez-Posada JC, de la Peña P, Tomczak AP, Fernández-Trillo J, Leipscher U, Stühmer W, Barros F, Pardo LA. (2015). Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains. *Nat Commun.* 6:6672. doi: 10.1038/ncomms7672.
- Lowden, P. A. S., Böhm, G. A., Staunton, J., & Leadlay, P. F. (1996). The nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie (International Ed.)*, 35(19), 2249-2251. doi:10.1002/anie.199622491
- Lu, M., Wang, J., Ives, H. E., & Pearce, D. (2011). mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30647-30654. doi:10.1074/jbc.M111.257592
- Ma, X. M., Yoon, S., Richardson, C. J., Jülich, K., & Blenis, J. (2008). SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, 133(2), 303-313. doi:10.1016/j.cell.2008.02.031
- MacKinnon R. (2003). Potassium channels. *FEBS Lett.* 555(1):62-5. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01104-9. PMID: 14630320.
- Magaway, C., Kim, E., & Jacinto, E. (2019). Targeting mTOR and metabolism in cancer: Lessons and innovations. *Cells (Basel, Switzerland)*, 8(12), 1584. doi:10.3390/cells8121584
- Mahajan, D., Sen, S., Kuila, B., Sharma, A., Arora, R., Sagar, M., . . . Dugar, S. (2020). Discovery and development of SPR519 as a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of PI3K α and mTOR kinases for the treatment of solid tumors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(19), 11121-11130. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01061
- Malsam, J., Satoh, A., Pelletier, L., & Warren, G. (2005). Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 307(5712), 1095-1098. doi:10.1126/science.1108061

- Martel RR, Klicius J, Galet S. (1997). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol.* 55(1):48-51. doi: 10.1139/y77-007. PMID: 843990.
- Menon, S., Dibble, C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A., Takahashi, H., . . . Manning, B. (2014). Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*, 156(4), 771-785. doi:10.1016/j.cell.2013.11.049
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: Process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207
- Morel, J., Palao, J., Castells, J., Desgeorges, M., Busso, T., Molliex, S., . . . Freyssenet, D. (2017). Regulation of akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in locomotor and respiratory muscles during experimental sepsis in mice Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/s41598-017-11440-5
- Morgan, M. T., Haj-Yahya, M., Ringel, A. E., Bandi, P., Brik, A., & Wolberger, C. (2016). Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 351(6274), 725-728. doi:10.1126/science.aac5681
- Nazio, F., Strappazzon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., . . . Cecconi, F. (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature Cell Biology*, 15(4), 406-416. doi:10.1038/ncb2708
- Nelson, J. F., Carter, C. S., Pahor, M., Frenkel, K., Miller, R. A., Nadon, N. L., . . . Strong, R. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature (London)*, 460(7253), 392-395. doi:10.1038/nature08221
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews*, 85(4), 1205-1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005

- Nogawa, H., & Kawai, T. (2014). hERG trafficking inhibition in drug-induced lethal cardiac arrhythmia. *European Journal of Pharmacology*, 741, 336-339. doi:10.1016/j.ejphar.2014.06.044
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., . . . Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15461-15464. doi:10.1074/jbc.C200665200
- Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Castellano, A., & López-Barneo, J. (2000). Collapse of conductance is prevented by a glutamate residue conserved in voltage-dependent K(+) channels. *The Journal of General Physiology*, 116(2), 181-190. doi:10.1085/jgp.116.2.181
- Pernice, H. F., Schieweck, R., Kiebler, M. A., & Popper, B. (2016). mTOR and MAPK: From localized translation control to epilepsy. *BMC Neuroscience*, 17(1), 73. doi:10.1186/s12868-016-0308-1
- Perry, M., Sachse, F. B., & Sanguinetti, M. C. (2007). Structural basis of action for a human ether-a-go-go-related gene 1 potassium channel activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 104(34), 13827-13832. doi:10.1073/pnas.0703934104
- Perry, M., Sanguinetti, M., & Mitcheson, J. (2010). SYMPOSIUM REVIEW: Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers. *The Journal of Physiology*, 588(17), 3157-3167. doi:10.1113/jphysiol.2010.194670
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., . . . Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137(5), 873-886. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046
- Peterson, T., Sengupta, S., Harris, T., Carmack, A., Kang, S., Balderas, E., . . . Sabatini, D. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), 408-420. doi:10.1016/j.cell.2011.06.034

- Ramos, F. J., Chen, S. C., Garelick, M. G., Dai, D., Liao, C., Schreiber, K. H., . . . Kennedy, B. K. (2012). Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Science Translational Medicine*, 4(144), 144ra103. doi:10.1126/scitranslmed.3003802
- Roux, B. (2017). Ion channels and ion selectivity. *Essays in Biochemistry*, 61(2), 201-209. doi:10.1042/EBC20160074
- Salem, J., Dureau, P., Bachelot, A., Germain, M., Voiriot, P., Lebourgeois, B., . . . Funck-Brentano, C. (2018). Association of oral contraceptives with drug-induced QT interval prolongation in healthy nonmenopausal women. *JAMA Cardiology*, 3(9), 877-882. doi:10.1001/jamacardio.2018.2251
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*.81(2):299-307. doi: 10.1016/0092-8674(95)90340-2. PMID: 7736582.
- Sanguinetti, M., Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440, 463–469 doi:10.1038/nature04710
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., . . . Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell*, 25(6), 903-915. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.003
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J., Hsu, P. P., Bagley, A. F., . . . Sabatini, D. M. (2006a). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and akt/PKB. *Molecular Cell*, 22(2), 159-168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029
- Sarbassov D. D., Ali, S. M., Kim, D., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., . . . Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology*, 14(14), 1296-1302. doi:10.1016/j.cub.2004.06.054

- Sciarretta, S., Zhai, P., Maejima, Y., Del Re, D., Nagarajan, N., Yee, D., . . . Sadoshima, J. (2015). mTORC2 regulates cardiac response to stress by inhibiting MST1. *Cell Reports (Cambridge)*, 11(1), 125-136. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.010
- Sciarretta, S., Zhai, P., Volpe, M., & Sadoshima, J. (2012). Pharmacological modulation of autophagy during cardiac stress. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(3), 235-241. doi:10.1097/FJC.0b013e3182575f61
- Sciarretta S, Forte M, Frati G, Sadoshima J. New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. (2018). *Circ Res*.122(3):489-505. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311147. PMID: 29420210; PMCID: PMC6398933.
- Shafer, A., Zhou, C., Gehrig, P. A., Boggess, J. F., & Bae-Jump, V. L. (2010). Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis¹ Wiley. doi:10.1002/ijc.24837
- Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., & Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 108(12), 4788-4793. doi:10.1073/pnas.1100844108
- Simamora, P., Alvarez, J. M., & Yalkowsky, S. H. (2001). Solubilization of rapamycin Elsevier BV. doi:10.1016/s0378-5173(00)00617-7
- Smith, J. L., Anderson, C. L., Burgess, D. E., Elayi, C. S., January, C. T., & Delisle, B. P. (2016). Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 2. *Journal of Arrhythmia*, 32(5), 373-380. doi:10.1016/j.joa.2015.11.009
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042
- Steele, D.F., Eldstrom, J., Fedida, D. (2007). Mechanisms of cardiac potassium channel trafficking. *J.Physiol*.582,17–26.

- Sun, T., Guo, J., Shallow, H., Yang, T., Xu, J., Li, W., Hanson, C., Wu, J.G., Li, X., Massaelli, H., Zhang, S. (2011). The role of monoubiquitination in endocytic degradation of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channels under low K⁺ conditions. *J. Biol. Chem.* 286, 6751–6759
- Sosanya, N. M., Brager, D. H., Wolfe, S., Niere, F., & Raab-Graham, K. F. (2014). Rapamycin reveals an mTOR-independent repression of Kv1.1 expression during epileptogenesis. *Neurobiology of Disease*, 73, 96-105. doi:10.1016/j.nbd.2014.09.011
- Tamai, T., Yamaguchi, O., Hikoso, S., Takeda, T., Taneike, M., Oka, T., . . . Otsu, K. (2013). Rheb (ras homologue enriched in brain)-dependent mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation becomes indispensable for cardiac hypertrophic growth after early postnatal period. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 10176-10187. doi:10.1074/jbc.M112.423640
- Tamura, F., Sugimoto, S., Sugimoto, M., Sakamoto, K., Yamaguchi, M., Suzuki, T., . . . Kurokawa, J. (2021). The effect of a synthetic estrogen, ethinylestradiol, on the hERG block by E-4031. *Biomolecules (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1385. doi:10.3390/biom11091385
- Thomson, S. J., Hansen, A., & Sanguinetti, M. C. (2014). Concerted all-or-none subunit interactions mediate slow deactivation of human ether-à-go-go-related gene K⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23428-23436. doi:10.1074/jbc.M114.582437
- Ti, Y., Xie, G., Wang, Z., Bi, X., Ding, W., Wang, J., . . . Zhang, W. (2011). TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes (New York, N.Y.)*, 60(11), 2963-2974. doi:10.2337/db11-0549
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F., & Zheng, X. F. S. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*, 12(3), 112-124. doi:10.1016/j.drudis.2006.12.008
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B & Robertson GA (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269, 92–95.

- Urrutia, J., Alday, A., Gallego, M., Malagueta-Vieira, L. L., Aréchiga-Figueroa, I. A., Casis, O., & Sánchez-Chapula, J. A. (2016). Mechanisms of IhERG/IKr modulation by α 1-adrenoceptors in HEK293 cells and cardiac myocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(6), 1261-1273. doi:10.1159/000453180
- Vaddi, D. R., Piao, L., Khan, S. A., Wang, N., Prabhakar, N. R., & Nanduri, J. (2019). Hypoxia induced hERG trafficking defect linked to cell cycle arrest in SH-SY5Y cells. *PloS One*, 14(4), e0215905. doi:10.1371/journal.pone.0215905
- Vandenberg, J. I., Perry, M. D., Perrin, M. J., Mann, S. A., Ke, Y., & Hill, A. P. (2012). hERG K⁺ channels: Structure, function, and clinical significance. *Physiological Reviews*, 92(3), 1393-1478. doi:10.1152/physrev.00036.2011
- Ventura-Aguiar, P., Campistol, J. M., & Diekmann, F. (2015). Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation Informa Healthcare. doi:10.1517/14740338.2016.1132698
- Vézina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (ay-22, 989), a new antifungal antibiotic. *Journal of Antibiotics*, 28(10), 721-726. doi:10.7164/antibiotics.28.721
- Wang, S., Livingston, M. J., Su, Y., & Dong, Z. (2015). Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways Informa UK Limited. doi:10.1080/15548627.2015.1023983
- Wong, G. K., Griffith, S., Kojima, I., & Demain, A. L. (1998). Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, prolylrapamycin, 32-desmethylrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin. *Journal of Antibiotics*, 51(5), 487-491. doi:10.7164/antibiotics.51.487
- Wong, M. (2012). mTOR as a potential treatment target for epilepsy. *Future Neurology*, 7(5), 537-545. doi:10.2217/fnl.12.45
- Wu, W., PhD, & Sanguinetti, M. C., PhD. (2016). Molecular basis of cardiac delayed rectifier potassium channel function and pharmacology. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 8(2), 275-284. doi:10.1016/j.ccep.2016.01.002

- Wu, W., Sachse, F. B., Gardner, A., & Sanguinetti, M. C. (2014). Stoichiometry of altered hERG1 channel gating by small molecule activators. *The Journal of General Physiology*, 143(4), 499-512. doi:10.1085/jgp.201311038
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016
- Yao, J., Gao, X., Chow, C., Zhan, X., Hu, C., & Mei, Y. (2012). Neuritin activates insulin receptor pathway to up-regulate Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(49), 41534-41545. doi:10.1074/jbc.M112.390260
- Yao, J., Sun, J., Zhao, Q., Wang, C., & Mei, Y. (2013). Neuregulin-1/ErbB4 signaling regulates Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current through the akt/mTOR pathway. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 305(2), 197-206. doi:10.1152/ajpcell.00041.2013
- Yoo, Y. J., Kim, H., Park, S. R., & Yoon, Y. J. (2016). An overview of rapamycin: From discovery to future perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(4-5), 537-553. doi:10.1007/s10295-016-1834-7
- Yuan, H., Russell, R. C., & Guan, K. (2013). Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*, 9(12), 1983-1995. doi:10.4161/auto.26058
- Yuan, R., Kay, A., Berg, W. J., & Leibold, D. (2009). Targeting tumorigenesis: Development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, 2(1), 45. doi:10.1186/1756-8722-2-45
- Zeng, H., Lozinskaya, I. M., Lin, Z., Willette, R. N., Brooks, D. P., & Xu, X. (2006). Mallotoxin is a novel Human Ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel activator. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(2), 957-962. doi:10.1124/jpet.106.110593
- Zhang, J., Chen, X. X., Xue, Y., Gamper, N., & Zhang, X. (2018). Beyond voltage-gated ion channels: Voltage-operated membrane proteins and cellular processes Wiley. doi:10.1002/jcp.26555