



Universidad Autónoma
de Madrid

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Caracterización de la mutación R735X de *PKP2* en el fenotipo estructural de la Cardiomiopatía Arritmogénica

Tesis doctoral: Cristina Márquez López

Director: Juan Antonio Bernal

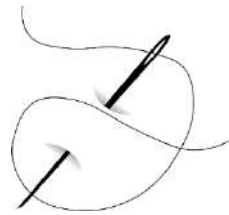
Codirectora: Cristina Sánchez Ramos

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)



Madrid, 2021

A mi yaya, Rosario



Agradecimientos

Agradecimientos

En primer lugar, quería dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Juan Antonio Bernal, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en un momento en el que para mí, la ciencia ya no era una opción a seguir. Gracias por todo lo aprendido, y por enseñarme a ser una persona independiente y con criterio propio.

A mi codirectora, Cristina. Solo tú sabes cómo es realmente trabajar conmigo codo con codo, por eso quería que formaras parte de esto. Creo que hacemos un gran equipo. Muchas gracias por la paciencia, por enseñarme, por ayudarme en todo, siempre con las mejores palabras y los mejores consejos. Eres un gran ejemplo a seguir, te admiro como persona y como científica.

A tod@s mis compañer@s de laboratorio, gracias por vuestra ayuda y por vuestro cariño siempre. A Cristina, mi tocaya, compañera y amiga. Contigo empezó todo. Gracias por estar siempre a mi lado, para lo mejor y para lo peor, has sido mi mayor apoyo. Eres de esas personas que sé que siempre estarán en mi vida. A Silvia, eres la mejor persona que conozco, siempre dispuesta a ayudar, a dar lo mejor de ti y siempre viendo lo mejor de cada persona. NY 2019 fue inolvidable, con vosotras dos repetiría mil veces. A Mariya, gracias por tu grandísima ayuda, sin ti muchas cosas no hubieran sido posibles, pero sobre todo por tu increíble personalidad, gracias por transmitir tanta alegría, incluso en los momentos más difíciles. A David, muchas gracias por toda la ayuda en el animalario, por ser una persona tan curiosa y por todas las risas. Los viernes de OP sin ti, ya no son lo mismo. A Marisa, desde el primer día que te conocí supe que eras mi versión canaria, aunque a ti te gusta hacer ejercicio. Gracias por tu buen humor y simpatía, por estar siempre dispuesta a todo y por compartir conmigo el honor de ser las más “viejas del labo”. A David, el de la estancia más breve de la historia, solo fue un mes, pero me bastó para conocer la gran persona que eres. Gracias por todas las risas y las tonterías en un momento en el que realmente lo necesitaba. A Nieves, aunque ha sido poco tiempo, muchas gracias por ser tan amable siempre, y por todos los consejos desinteresados que da la experiencia. A Dani, gracias por intentar hacerme reír, con chistes lamentables, música surrealista o inventando genes como el MFG, aunque sabes que no soy tu tipo de público. Eres una grandísima persona y un gran profesional, te mereces lo mejor, y nosotros nos merecemos el cielo por aguantarte (XD).

A los “Manzanares”, “Hidalgos” y “Alegres”, gracias por vuestra ayuda, sobre todo cuando se trataba de pedir, en especial a Diana y Carmen, por introducirme desinteresadamente en el mundo de la expresión y purificación de proteínas y a Elías, por todos tus consejos.

A Tamara, Briane y Marcos, que juntos con mis niñas del labo, me hicisteis pasar las mejores fiestas. El verano de 2019 fue legendario.

A Ruth y Ali, fuisteis las primeras personas que conocí en Madrid. Mi tiempo trabajando con vosotras fue el más divertido de todos los que he pasado aquí, sin ninguna duda. Sé que os esforzasteis (sobre todo Ruth) en intentar entenderme al hablar, pero luego llegó Paula y lo hizo todo mucho más fácil, ¿no illa?. Muchas gracias a las tres, amigas, por estar siempre, por todos los buenos momentos, dentro y fuera del labo. Simplemente gracias por ser como sois. Os quiero y os admiro a partes iguales.

A mis padres, Isaías y Esther, muchas gracias por TODO. Por apoyarme en todas mis decisiones, algunas mejores que otras. Por plantaros aquí siempre que lo he necesitado y más, haciendo parecer que la distancia Granada-Madrid eran 40 Km en lugar de 400. A mi hermana, Ana, eres la persona que más admiro del mundo y la que mejor me conoce. Siempre he pensado que eres una versión súper mejorada de mí misma. Gracias por estar siempre cuando te necesito, sea lo que sea, por ser tan comprensiva, cariñosa y valiente. Os quiero infinito.

A Ismael, mi compañero de vida. Gracias por atreverte con todo y compartir conmigo las mejores aventuras. Pero sobre todo, gracias por compartir también desventuras, por escucharme en mis peores agobios y hacerme sentir que eres el mejor apoyo que podría tener cada día, incluso cuando nos separaban casi 2000 Km. Gracias por estar siempre conmigo. Me siento muy afortunada.

Resumen

La forma genética más prevalente en la cardiomiopatía arritmogénica (ACM, del inglés “arrhythmogenic cardiomyopathy”) es causada por mutaciones en la placofilina-2 (*PKP2*). La mayoría de las mutaciones en *PKP2* descritas en pacientes con ACM, generan proteínas truncadas. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales estas mutaciones en *PKP2* provocan el desarrollo de la ACM, son poco conocidos. El objetivo de este estudio fue investigar los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de un fenotipo estructural de ACM, inducido por mutaciones que provocan la delección de la región C-terminal de *PKP2* (CT) e identificar posibles dianas terapéuticas. En este trabajo se caracterizó el efecto de la proteína mutante de *PKP2* con delección de la región CT, R735X. Para ello, mediante el uso de imagen por resonancia magnética cardíaca (MRI), se observó que la función cardíaca del ventrículo derecho (VD) estaba comprometida en ratones transducidos con AAV-R735X. Además, combinando diversas técnicas como microscopía confocal, microscopio de fuerza atómica (AFM) o transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), se observó que la presencia del mutante R735X, alteraba la distribución de los componentes del citoesqueleto de actomiosina, su estructura y las propiedades de los filamentos, afectando a la arquitectura celular. Este trabajo revela que *PKP2* es capaz de influir en la regulación del citoesqueleto de actina a través de la modulación de la actividad de la MYH10, lo que sugiere que la proteína mutante R735X actúa como un mutante con ganancia de función. El modelo tridimensional de la estructura de *PKP2*, reveló que la región CT era necesaria para estabilizar la estructura de la proteína. Por tanto, la proteína mutante R735X sufría un cambio conformacional y exponía una región interna que en la estructura de *PKP2* “wild-type” quedaba oculta, alterando su función, su localización y su interacción con otras proteínas. La oclusión estérica de esta región interna, en la proteína R735X-Ctag, condujo a una recuperación parcial del fenotipo estructural que provocaba el mutante R735X, indicando que puede ser una nueva diana terapéutica en la ACM.

Abstract

The most prevalent genetic form of arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) is caused by mutations in plakophilin-2 (*PKP2*). Most of the *PKP2* mutations described in ACM patients, generate truncated proteins. However, the mechanisms of how mutations in *PKP2* lead to ACM, are poorly understood. The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms underlying the development of a structural phenotype of ACM, induced by mutations that cause the deletion of the C-terminal region of *PKP2* (CT) and to identify potential therapeutic targets. In this study, the effect of the mutant *PKP2* protein with deletion of the CT region, R735X, was characterized. To do this, by using cardiac magnetic resonance imaging (MRI) we detected impaired right ventricle (RV) cardiac function in mice transduced with AAV-R735X. In addition, combining confocal microscopy, atomic force microscope (AFM) or Förster resonance energy transfer (FRET), it was observed that the expression of R735X mutant altered the actomyosin cytoskeleton components distribution, structure and the properties of the filaments, affecting the cellular architecture. This work reveals that *PKP2* is able to influence the regulation of the actin cytoskeleton through modulation of MYH10 activity, suggesting that the R735X mutant protein acts as a gain-of-function mutant. Computational modeling of *PKP2* structure, revealed that the CT region was necessary for the stabilization of the protein structure. Therefore, the mutant R735X protein underwent a conformational change and exposed an internal region that was hidden in the *PKP2* "wild-type" structure, altering its function, its location and its interaction with other proteins. Steric occlusion of this internal region, in the mutant protein R735X-Ctag, led to a partial recovery of the structural phenotype caused by R735X mutant, indicating that it may be a new therapeutic target in ACM.

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 7 |
| Resumen | 11 |
| Abstract..... | 15 |
| Índice..... | 19 |
| Clave de abreviaturas..... | 25 |
| Introducción..... | 29 |
| 1. Cardiomiopatías hereditarias..... | 29 |
| 2. Cardiomiopatía arritmogénica | 30 |
| 2.1. La evolución en la definición de la cardiomiopatía arritmogénica..... | 30 |
| 2.2. Incidencia de la ACM..... | 31 |
| 2.3. Manifestaciones clínicas de la ACM | 31 |
| 2.4. Diagnóstico clínico de ACM..... | 33 |
| 2.5. Tratamiento para la ACM | 35 |
| 2.6. Etiología de la ACM | 35 |
| 3. Desmosoma y “ <i>area composita</i> ” | 38 |
| 4. Placofilina-2 (<i>PKP2</i>) | 39 |
| 4.1. Estructura y función | 39 |
| 4.2. Mutaciones patogénicas relacionadas con la ACM..... | 39 |
| 4.3. Mutación R735X..... | 41 |
| 4.4. Relación de las mutaciones de <i>PKP2</i> con los fenotipos de la ACM | 42 |
| 5. El citoesqueleto en la patología cardíaca..... | 44 |
| Objetivos..... | 51 |
| Materiales y métodos | 55 |
| 1. Plásmidos | 55 |
| 2. Clonaje | 58 |
| 3. Cultivos celulares | 58 |
| 4. Producción de vectores virales | 60 |
| 5. Animales..... | 61 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| 6. | Inmunofluorescencia | 64 |
| 7. | Análisis de las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias | 66 |
| 8. | Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 68 |
| 9. | Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) | 68 |
| 10. | Extracción de proteína total..... | 69 |
| 11. | Análisis del Ratio F-actina: G-actina | 71 |
| 12. | Extracción de proteínas de la membrana plasmática | 71 |
| 13. | Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)..... | 72 |
| 14. | Aislamiento y purificación de ARN y qPCR..... | 72 |
| 15. | Modelo tridimensional de las proteínas PKP2, R735X y R735X-EGFP..... | 73 |
| 16. | Análisis estadístico | 74 |
| Resultados..... | | 77 |
| 1. | Caracterización del mutante patogénico de PKP2 R735X..... | 77 |
| 1.1. | La proteína mutante R735X se acumula menos eficientemente que la proteína PKP2 “wild-type” | 77 |
| 1.2. | La proteína mutante R735X está deslocalizada | 78 |
| 1.3. | El mutante R735X no afecta a la función de PKP2 | 80 |
| 1.4. | La región C-terminal de PKP2 estabiliza la estructura de la proteína | 82 |
| 2. | Caracterización del fenotipo estructural relacionado con la cardiomiopatía arritmogénica provocado por la mutación R735X | 83 |
| 2.1. | El mutante R735X altera la contracción y la función ventricular | 84 |
| 2.2. | PKP2 interacciona con proteínas del citoesqueleto..... | 86 |
| 2.3. | El mutante R735X interfiere en la correcta localización de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina | 89 |
| 2.4. | El mutante R735X altera la distribución de la MYH9 y MYH10 | 91 |
| 2.5. | El mutante R735X altera el citoesqueleto de actina | 94 |
| 2.6. | El mutante R735X altera el citoesqueleto de actina a través de su efecto sobre la MYH10..... | 102 |
| 3. | El cambio estructural de la proteína R735X es crítico en su ganancia de función | 106 |
| 3.1. | Ocluir estéricamente la región interna en la proteína R735X, estabiliza el dominio N-terminal y mejora su localización..... | 106 |
| 3.2. | La proteína R735X-Ctag mejora la estructura del citoesqueleto de actomiosina respecto al mutante R735X..... | 108 |
| 3.3. | La proteína R735X-Ctag mejora la función ventricular respecto al mutante R735X | 113 |

| | |
|--|-----|
| Discusión | 117 |
| Caracterización del mutante de <i>PKP2</i> R735X..... | 117 |
| Fenotipo estructural de la cardiomiopatía arritmogénica | 120 |
| Efecto de la proteína R735X sobre el citoesqueleto de actomiosina..... | 121 |
| Terapia génica | 126 |
| Conclusiones | 129 |
| Bibliografía | 133 |

Clave de abreviaturas

| | |
|----------|--|
| AAV | Virus Adeno-asociados |
| ACM | Cardiomiopatía arritmogénica |
| ACTA | Actina sarcomérica |
| ACTB | Actina citoplasmática |
| AFM | Microscopio de fuerza atómica |
| ARM | Dominio interno armadillo |
| CAG | Promotor de b-actina de pollo con un potenciador del CMV |
| CMV | Promotor del citomegalovirus |
| Co-IP | Co-Inmunoprecipitación |
| cpstFRET | FRET circularmente permutado sensible al estiramiento |
| cTnT | Promotor de la troponina T cardiaca |
| DSC | Desmocolina |
| DSG | Desmogleína |
| DSP | Desmoplaquina |
| ECG | Electrocardiograma |
| EGFP | Proteína fluorescente verde mejorada |
| FE | Fracción de eyección |
| FRET | Transferencia de energía de resonancia de Förster |
| HEK293T | Células embrionarias humanas de riñón |
| HL-1 | Línea celular de músculo cardiaco |
| ITR | Secuencia de repetición terminal invertida |
| JUP | Placoglobina |
| MET | Microscopio electrónico de transmisión |
| MRI | Imagen cardiaca por resonancia magnética |
| MS | Espectrometría de masas |
| MYH10 | Miosina 10 |
| MYH9 | Miosina 9 |
| NMII | Miosinas no musculares 2 |
| PB | <i>PiggyBac</i> |
| PKP2 | Placofilina-2 |
| R735X | Mutante de PKP2 |

Clave de abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| R735X-Ctag | Mutante de fusión R735X-EGFP |
| <i>shPKP2</i> | ARN de horquilla corta para silenciar la expresión de <i>PKP2</i> |
| VD | Ventrículo derecho |
| VDF | Volumen diastólico final |
| VI | Ventrículo izquierdo |
| VSF | Volumen sistólico final |

Introducción

1. Cardiomiopatías hereditarias

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad en la actualidad, con una incidencia anual de aproximadamente el 31% de todas las muertes registradas en el mundo, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, estas muertes no siempre están relacionadas con el incremento de la longevidad o con malos hábitos de salud, si no que pueden tener un fuerte componente genético. De hecho, las cardiomiopatías hereditarias son una de las principales causas de enfermedad cardíaca en todos los grupos de edad, a menudo con un inicio en la adolescencia o en la edad adulta temprana, y están asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas (Masarone et al., 2018; Watkins et al., 2011). Los grandes avances de las últimas décadas han permitido poder descifrar la base genética de muchas de estas enfermedades, así como su diagnóstico. Sin embargo, los tratamientos solo se llevan a cabo con terapia invasiva o farmacología paliativa (William J. McKenna et al., 2017; Watkins et al., 2011). Por tanto, urge la necesidad de comprender los mecanismos moleculares fundamentales involucrados en el inicio y el desarrollo de estas enfermedades para poder desarrollar terapias eficaces.

En las cardiomiopatías hereditarias se hace una distinción entre las cardiomiopatías estructurales arritmogénicas, los síndromes de arritmias y las miopatías mitocondriales (Beckmann et al., 2011; Brieler et al., 2017; William J. McKenna et al., 2017).

Entre las cardiomiopatías estructurales arritmogénicas hereditarias más frecuentes, se encuentran la cardiomiopatía hipertrófica, la cardiomiopatía dilatada, la cardiomiopatía no compactada de ventrículo izquierdo y la cardiomiopatía arritmogénica (ACM, del inglés "arrhythmogenic cardiomyopathy"). Mutaciones en diferentes genes que codifican proteínas que se encuentran en los desmosomas, en los sarcómeros, en el citoesqueleto o en la membrana nuclear, provocan cambios estructurales en el tejido cardíaco, que pueden relacionarse con la presencia de arritmias en el paciente, e incluso muerte súbita (Beckmann et al., 2011; Nishimura et al., 2017; Reichart et al., 2019).

Los síndromes de arritmias hereditarios incluyen varias enfermedades diferentes como el síndrome del QT largo, el síndrome de Brugada, el síndrome del QT corto y la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. Las arritmias ventriculares características de estos síndromes, son causadas por mutaciones que provocan disfunción de los canales iónicos del

músculo cardíaco (enfermedad de los canales iónicos). Sin embargo, en pacientes que sufren alguna de estas enfermedades, el corazón no presenta ningún tipo de alteración estructural, ni siquiera en pacientes que hubieran fallecido por muerte súbita (Beckmann et al., 2011; Gray & Behr, 2016).

Las miopatías mitocondriales que conllevan patologías cardíacas, generalmente involucran mutaciones en el ADN mitocondrial y sus manifestaciones pueden ser estructurales, funcionales, o ambas. Entre los defectos cardíacos asociados a mutaciones en el ADN mitocondrial, la cardiomiopatía hipertrófica es la más común (Ahmed et al., 2018; Beckmann et al., 2011; Lee & Han, 2017).

2. Cardiomiopatía arritmogénica

2.1. La evolución en la definición de la cardiomiopatía arritmogénica

El cambio de nomenclatura desde principios de 1980, refleja la evolución en el conocimiento sobre la cardiomiopatía arritmogénica (ACM). La primera descripción anatómica y clínica de la enfermedad fue en 1977 y se la denominó “displasia del ventrículo derecho”, por ser considerada una anomalía congénita en el desarrollo del miocardio del ventrículo derecho (Elias Neto et al., 2018; Fontaine et al., 1993). A partir de entonces, diversos estudios morfológicos y clínicos, demostraron que la ACM no era un defecto estructural presente al nacer, si no una enfermedad adquirida y progresiva del miocardio, por lo que el término displasia se reemplazó por “cardiomiopatía de ventrículo derecho” (Thiene et al., 1988). Durante el mismo periodo, las arritmias ventriculares fueron reconocidas como una manifestación clínica predominante de la ACM y muchos artículos se referían a ella como “displasia arritmogénica de ventrículo derecho” o “cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho” (W. J. McKenna et al., 1994). Posteriormente, se descubrió que la enfermedad podía ser causada por mutaciones en los genes de los desmosomas cardíacos, lo que reforzó la idea de que se trataba de una cardiomiopatía y permitió su inclusión en la clasificación de las cardiomiopatías de la OMS en 1995 (Elias Neto et al., 2018; Richardson et al., 1996). Durante muchos años se ha empleado el término “cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho” (ARVC del inglés, “*arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*”) debido a que el fenotipo de la enfermedad se caracteriza por una afectación predominante del ventrículo derecho (Corrado Domenico et al., 2017). Sin embargo, se ha demostrado que el espectro de la enfermedad es más amplio de lo que se pensaba

inicialmente, con la identificación de casos que afectan al ventrículo izquierdo de forma tardía en la enfermedad, formas biventriculares e incluso formas que afectan de manera predominante al ventrículo izquierdo, con afectación del ventrículo derecho limitada o ausente (Gallo et al., 1992; Michalodimitrakis et al., 2002). Estos hallazgos, han provocado que en los últimos años se utilice el término más amplio de cardiomiopatía arritmogénica (ACM) para englobar todas las expresiones fenotípicas de la enfermedad (Basso et al., 2012; Bennett et al., 2019).

2.2. Incidencia de la ACM

La ACM está clasificada como una patología cardíaca rara (ORPHA247) (Alcalde et al., 2014) y su prevalencia estimada en la población general oscila entre 1:2000 y 1:5000 (Azaouagh et al., 2011). La prevalencia de ACM entre víctimas de muerte súbita es relativamente alta, siendo esta enfermedad una de las principales causas de muerte súbita cardíaca entre jóvenes y atletas. Debido a que la manifestación inicial puede ser muerte súbita cardíaca, probablemente los pacientes no diagnosticados constituyen un 30% adicional en la mayoría de las poblaciones (Corrado Domenico et al., 2017; Elias Neto et al., 2018). La mayoría de los estudios revelan que la ACM tiene una mayor incidencia y una mayor gravedad en los hombres que en las mujeres, con una proporción aproximada de 3:1. Esto se ha atribuido a la influencia directa de las hormonas sexuales en la expresión fenotípica de la enfermedad o a las diferencias relacionadas con el sexo en la cantidad e intensidad del ejercicio (Azaouagh et al., 2011; Corrado Domenico et al., 2017). La aparición de ACM en individuos menores de 12 años de edad, o mayores de 60 años es extremadamente rara (Elias Neto et al., 2018).

2.3. Manifestaciones clínicas de la ACM

La ACM es una enfermedad cardíaca que abarca un amplio espectro de fenotipos (Costa et al., 2020). La sospecha de ACM clásica suele surgir cuando personas jóvenes y/o atléticas, se presentan con palpitaciones cardíacas, síncope o paros cardíacos (Basso et al., 2012). Los pacientes afectados presentan normalmente arritmias ventriculares procedentes del ventrículo derecho, entre la segunda y la cuarta década de la vida. Sin embargo, la muerte súbita puede ocurrir en la adolescencia, siendo en muchas ocasiones, la primera manifestación de la enfermedad, incluso antes de que aparezcan cambios estructurales. Por otra parte, portadores

de mutaciones relacionadas con la ACM, también pueden permanecer asintomáticos durante toda la vida (Costa et al., 2020; Riele et al., 2014). La progresión general de la ACM, en su forma clásica (afectación dominante del ventrículo derecho), puede clasificarse en cuatro fases distintas (Costa et al., 2020; Elias Neto et al., 2018; Haugaa et al., 2016) (Fig. 1):

- Fase temprana “oculta” o silente: es la fase subclínica, en la que el paciente permanece asintomático. Pueden aparecer anomalías estructurales discretas en el ventrículo derecho, aunque suelen ser indetectables. En esta etapa, la muerte súbita cardiaca puede ser la primera manifestación de la enfermedad.
- Fase “eléctrica” o arritmica: en esta fase aparece un trastorno eléctrico evidente. El paciente tiene palpitaciones, síncope, anomalías en el electrocardiograma (ECG) y arritmias ventriculares sintomáticas con morfología de bloqueo de la rama izquierda. Estas arritmias ventriculares pueden darse desde una forma aislada hasta un episodio de muerte súbita debido a la fibrilación ventricular y en muchas ocasiones, pueden ocasionarse por el esfuerzo físico. Las anomalías estructurales se limitan principalmente a regiones específicas del ventrículo derecho y pueden ser detectables mediante imagen por resonancia magnética (MRI).
- Fase “estructural” o de fallo del ventrículo derecho: esta fase típicamente muestra una extensión de la enfermedad por el ventrículo derecho, con una pérdida progresiva del miocardio sano y su reemplazo por tejido fibroadiposo, que conduce a un deterioro progresivo de la función global del ventrículo derecho, con una relativa conservación del ventrículo izquierdo.
- Fase final: en una etapa avanzada, la enfermedad progresa a insuficiencia cardiaca del ventrículo derecho, del ventrículo izquierdo o biventricular, a menudo combinado con arritmias ventriculares. El fenotipo puede imitar a la cardiomiopatía dilatada avanzada, dificultando el diagnóstico diferencial en las etapas más avanzadas de la enfermedad.

La progresión de la enfermedad puede presentarse en momentos concretos o lo que se denomina “fases calientes”, en lugar de ser un proceso continuo. Los factores ambientales, como el ejercicio y la inflamación, pueden actuar como factores desencadenantes y facilitar la progresión de la enfermedad (Haugaa et al., 2016).

En los últimos años se han descrito formas no clásicas de ACM, las que afectan de manera predominante al ventrículo izquierdo y las biventriculares, las cuales muestran una presentación clínica atípica (Basso et al., 2012; Costa et al., 2020; Michalodimitrakis et al., 2002).

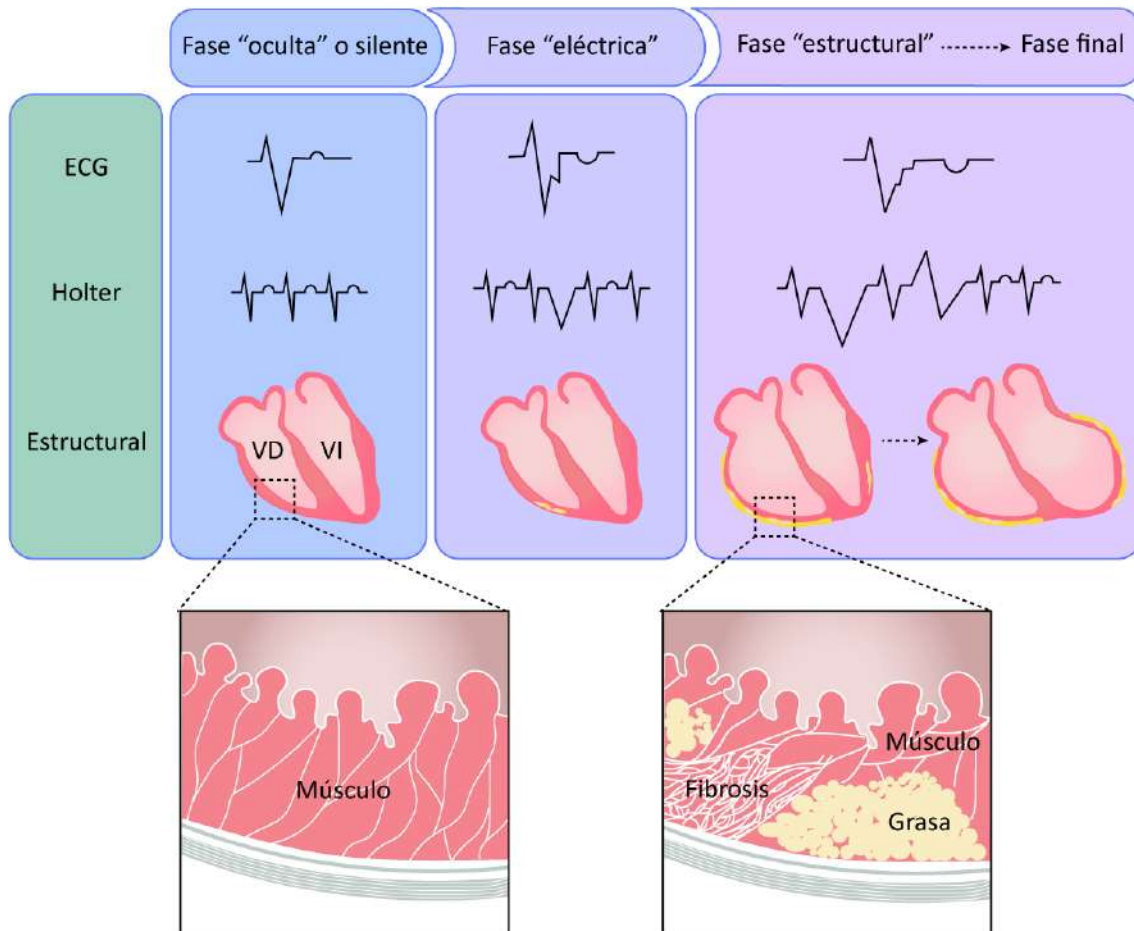


Figura 1. Progresión de la enfermedad en la ACM. Los cambios eléctricos en un ECG o por monitorización con Holter, son normalmente el primer signo de la enfermedad. Las anomalías estructurales se suelen observar en etapas más avanzadas de la enfermedad y las más comunes son el reemplazo del tejido miocárdico por tejido fibroadiposo. ECG: electrocardiograma; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo. Adaptado de te Riele et al., 2014.

2.4. Diagnóstico clínico de ACM

Debido a que es una enfermedad de baja prevalencia que carece de una sola prueba que pueda confirmar la afección, el diagnóstico de la ACM puede ser un desafío. Por eso, se han desarrollado los criterios del Grupo de trabajo (TFC, del inglés "*Task Force criteria*") por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Sociedad y Federación Internacional de Cardiología (SFIC), en un esfuerzo por estandarizar el diagnóstico de la ACM (Bennett et al., 2019; Stevens et al., 2020). Estos criterios son un conjunto de características clínicas, estructurales, electrocardiográficas y genéticas, que permiten que los casos clínicos puedan ser clasificados.

Los criterios del Grupo de Trabajo para el diagnóstico de la ACM que se emplean actualmente, se modificaron en 2010 y combinan varias modalidades de diagnóstico diferentes, incluyendo:

- Evaluación electrocardiográfica para detectar anomalías en la repolarización, que se manifiesta mediante la aparición de ondas T invertidas, y en la despolarización y/o la conducción eléctrica, como bloqueo completo o incompleto de la rama derecha, así como la aparición de ondas épsilon y un aumento de la duración del complejo QRS (Alcalde et al., 2015; Gandjbakhch et al., 2018; Sattar et al., 2019; Towbin et al., 2019).
- Evaluación de arritmias mediante ECG de 12 derivaciones, monitorización con Holter y/o prueba de esfuerzo para detectar la aparición de contracciones ventriculares prematuras, taquicardias ventriculares o morfología de bloqueo de la rama izquierda precoz (Alcalde et al., 2015; Corrado Domenico et al., 2017; Haugaa et al., 2016).
- Evaluación estructural por ecocardiografía, resonancia magnética y/o angiografía del ventrículo derecho para valorar la función ventricular. Los criterios principales que se tienen en cuenta son movimientos anormales de la pared del ventrículo derecho, un aumento del volumen diastólico final del ventrículo derecho (VDF-VD) o una disminución de la fracción de eyección del ventrículo derecho (FE-VD) (Alcalde et al., 2015; Sen-Chowdhry et al., 2006; Riele et al., 2014; Towbin et al., 2019).
- Evaluación histológica mediante biopsia endomiocárdica, valorando la lesión característica de la enfermedad, es decir, la pérdida de cardiomiocitos y su reemplazo por fibrosis e infiltración (Alcalde et al., 2015; Corrado Domenico et al., 2017; Towbin et al., 2019).
- Evaluación genética y familiar para identificar una mutación patogénica o posiblemente patogénica, en pacientes que ya cumplen con otros criterios de diagnóstico para la ACM y un historial familiar, que cubra al menos 3 generaciones, centrado en muertes prematuras inexplicables, arritmias y enfermedades que afecten a la conducción eléctrica (Corrado, 2019; Sattar et al., 2019; Towbin et al., 2019).

Las anomalías se clasifican en criterios mayores y menores para la ACM, estableciéndose tres grados de diagnóstico: definitivo, límite o posible (Azaouagh et al., 2011; Haugaa et al., 2016).

- El diagnóstico definitivo para la ACM incluye: dos criterios mayores o un criterio mayor y dos criterios menores, o cuatro criterios menores de diferentes categorías.
- El diagnóstico límite para la ACM incluye: un criterio mayor y uno menor, o tres criterios menores de diferentes categorías.

- El diagnóstico posible para la ACM incluye: uno o dos criterios menores de diferentes categorías.

Aunque los TFC 2010 aumentaban la especificidad del diagnóstico, todavía no eran lo suficientemente sensibles, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad, y tampoco eran aplicable a la ACM con formas biventriculares o de afectación predominante del ventrículo izquierdo (Bennett et al., 2019; Elias Neto et al., 2018). Para esto, surgen recientemente los criterios de Padua que, basándose en enfoque multiparamétrico de los TFC 2010, introduce nuevos criterios de ECG y de caracterización de tejidos por MRI para el ventrículo izquierdo (Corrado et al., 2020; Patel et al., 2020).

2.5. Tratamiento para la ACM

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz que pueda prevenir la progresión de la ACM. Tras diagnosticar a un paciente con ACM, las terapias se centran en el tratamiento de los síntomas para prevenir la aparición de sucesos letales. Los posibles tratamientos incluyen la restricción de ejercicio vigoroso o de alta intensidad, betabloqueantes, fármacos antiarrítmicos, ablación con catéter endocárdico o epicárdico y trasplante cardiaco. En aquellos pacientes que tienen un riesgo significativo de sufrir muerte súbita, se considera la inserción de un desfibrilador automático implantable (DAI), siendo esta la única terapia que ha demostrado disminuir la mortalidad en pacientes con ACM (Bennett et al., 2019; Platonov et al., 2019; Sattar et al., 2019; Stevens et al., 2020).

2.6. Etiología de la ACM

Hasta la fecha, se han identificado 16 genes asociados con el fenotipo de ACM (Elias Neto et al., 2018; Gandjbakhch et al., 2018). La herencia de la ACM es típicamente autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable (te Riele et al., 2014). En aproximadamente el 50% de los pacientes, se trata de una enfermedad genética causada por mutaciones en genes que codifican proteínas del desmosoma: placofilina-2 (*PKP2*), desmogleína-2 (*DSG2*), desmoplaquina (*DSP*), desmocolina-2 (*DSC-2*) y placoglobina (*JUP*) (Tabla 1). También se han identificado una minoría de pacientes afectados que presentan mutaciones en genes no desmosomales, y muchos han sido implicados en formas de enfermedad con afectación

predominante del ventrículo izquierdo o biventricular: titina (*TTN*), lámina A/C (*LMNA*), desmina (*DES*), filamina C (*FLNC*), N-cadherina (*CDH2*), α -T-Catenina (*CTNNA3*), proteína transmembrana 43 (*TMEM43*), fosfolamban (*PLN*), receptor de rianodina tipo 2 (*RYR2*), canal de sodio voltaje-dependiente subunidad α (*SCN5A*) y factor de crecimiento transformante β 3 (*TGFB3*) (Tabla 1) (Corrado, 2019; Patel et al., 2020).

| Gen | Proteína | Estructura | Frecuencia en CA | Ventrículo predominantemente afectado |
|---------------|------------------------------|----------------------------|------------------|---------------------------------------|
| <i>PKP2</i> | Placofilina-2 | Desmosoma | 20-45% | VD, BiV |
| <i>DSG2</i> | Desmogleína-2 | Desmosoma | 4-15% | VD, VI, BiV |
| <i>DSP</i> | Desmoplaquina | Desmosoma | 1-13% | VI, BiV |
| <i>DSC2</i> | Desmocolina- 2 | Desmosoma | 1-7% | VD, BiV |
| <i>JUP</i> | Placoglobina | Desmosoma | 0-1% | VD, BiV |
| <i>TTN</i> | Titina | Sarcómero | 18% | VD, VI, BiV |
| <i>LMNA</i> | Lámina A/C | Envuelta nuclear | 3-4% | VI, BiV |
| <i>DES</i> | Desmina | Filamentos intermedios | <1% | VI, BiV |
| <i>FLNC</i> | Filamina C | Entrecruzamiento de actina | 0-3% | VI, BiV |
| <i>CDH2</i> | N-Cadherina | Uniones adherentes | 0-2% | VD, BiV |
| <i>CTNNA3</i> | α -T-Catenina | Uniones adherentes | <1% | VD, BiV |
| <i>TMEM43</i> | Proteína transmembrana 43 | Envuelta nuclear | <1% | VD, BiV |
| <i>PLN</i> | Fosfolamban | Regulación de calcio | 0-12% | VI, BiV |
| <i>RYR2</i> | Receptor de rianodina tipo 2 | Regulación de calcio | 9% | VD |
| <i>SCN5A</i> | Na _v 1.5 | Canal de sodio | 0-2% | VI, BiV |

| | | | | |
|--------------|------------|-----------|------------|----|
| <i>TGFB3</i> | TGF-beta 3 | Citoquina | 2 familias | VI |
|--------------|------------|-----------|------------|----|

Tabla 1. Tabla resumen de los genes implicados en la ACM. VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; BiV: Bi-ventricular. Adaptada de Gandjbakhch et al., 2018 y Patel et al., 2020.

No obstante, la causa genética de la ACM sigue siendo desconocida para el 35-50% de los pacientes, lo que sugiere que hay genes no identificados u otras vías involucradas que a día de hoy se desconocen. Además, los individuos que portan mutaciones asociadas con la ACM pueden no llegar a manifestar la enfermedad, lo que indica que podrían estar implicados otros factores como el ejercicio físico y la inflamación (Patel et al., 2020). Por otra parte, puede presentarse un fenotipo similar al de la ACM en otras cardiomiopatías genéticas, síndromes cardio-cutáneos o trastornos neuromusculares, e incluso en enfermedades no genéticas, caracterizadas por la distintiva propensión a las arritmias ventriculares relacionadas con la aparición de fibrosis miocárdica, lo que conlleva un riesgo alto de sufrir muerte súbita cardíaca (Corrado, 2019; Towbin et al., 2019) (Fig. 2).

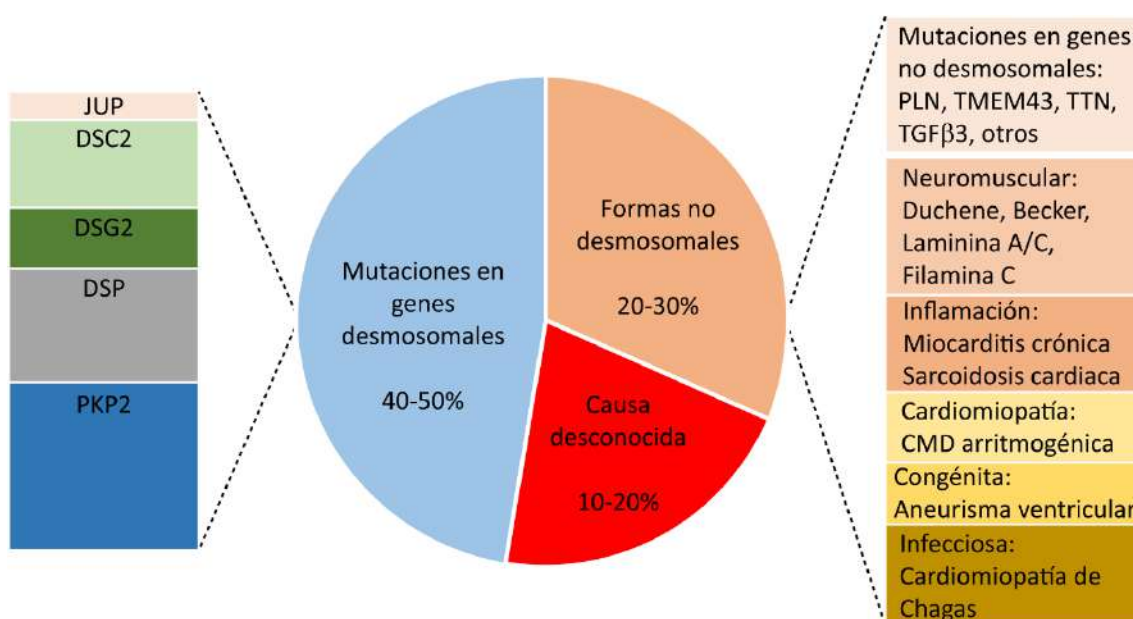


Figura 2. Propuesta de clasificación etiológica de la ACM. La causa más común de la cardiomiopatía arritmogénica es un defecto genético de los genes desmosomales, aunque existen otras causas genéticas y no genéticas. Adaptada de Corrado., 2019.

3. Desmosoma y “*area composita*”

La mayoría de las mutaciones que causan la ACM han sido identificadas en *PKP2*, *JUP* y *DSP*, por tanto, se considera que la ACM es principalmente, una enfermedad del desmosoma (Gerull et al., 2004). Los desmosomas son uniones intercelulares dinámicas esenciales para la adhesión celular y la integridad del tejido. Estructuralmente, están compuestos por proteínas transmembrana, las cadherinas desmosomales: desmogleína (DSG2) y desmocolina (DSC2); y una placa densa intracelular de proteínas: placoglobina (PKP2), placofilina (*JUP*) y desmoplaquina (*DSP*), que unen a las proteínas transmembrana con la red de filamentos intermedios de desmina (DES) (Gerull et al., 2004; Hatzfeld et al., 2014; Novelli et al., 2018) (Fig. 3). Los desmosomas no funcionan de forma independiente, si no que aparecen en el miocardio como un tipo de unión mixta junto a las uniones adherentes, que se conoce como “*area composita*”. El “*area composita*” proporciona el acoplamiento mecánico entre dos cardiomiocitos mediante el anclaje de los filamentos de actina y de los filamentos intermedios, aumentando la fuerza y la estabilidad del miocardio (Delmar & McKenna, 2010; Zhao et al., 2019).

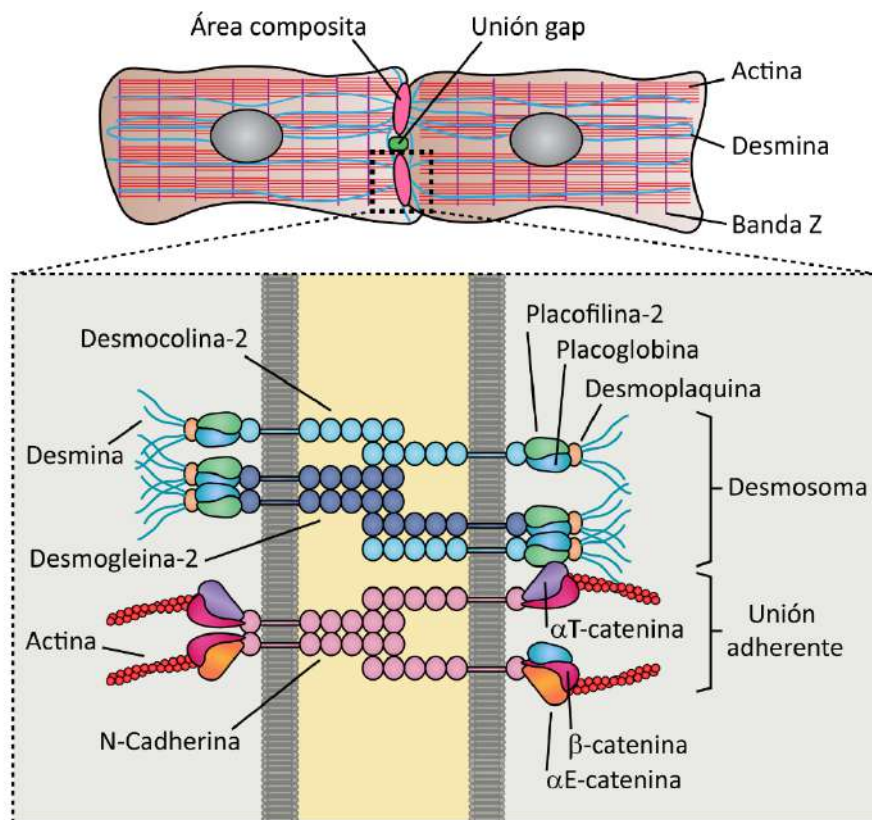


Figura 3. Composición del “*area composita*” cardiaca. El “*area composita*” está compuesta por dos estructuras: los desmosomas y las uniones adherentes.

4. Placofilina-2 (*PKP2*)

4.1. Estructura y función

El gen *PKP2* se caracterizó por primera vez en 1996 y codifica la proteína PKP2, la placofilina mayoritaria cardiaca (Novelli et al., 2018). PKP2 tiene un dominio armadillo central que contiene ocho repeticiones armadillo y dominios N- y C-terminales no estructurados (Al-Jassar et al., 2013). PKP2 se localiza en la placa densa del desmosoma y promueve la adhesión celular, por tanto, la función mecánica es su principal función reconocida. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito el papel pleiotrópico de esta proteína, ya que ejerce diferentes funciones, entre ellas, puede participar en la regulación electrofisiológica, en la regulación transcripcional y en la señalización celular (Gerull et al., 2004; Hatzfeld et al., 2014; Novelli et al., 2018).

4.2. Mutaciones patogénicas relacionadas con la ACM

Estudios de varias cohortes de pacientes a nivel mundial, confirman que las mutaciones en *PKP2* son las más comunes en la ACM y representan entre un 40 y un 70% de los pacientes con genotipo positivo (Alcalde et al., 2014; Awad et al., 2008; Bao et al., 2013; Gerull et al., 2004; Groeneweg et al., 2015; Novelli et al., 2018; Ohno et al., 2013). Un total de 140 mutaciones patogénicas en el gen de *PKP2* están registradas en la base de datos para la ACM (<https://molgenis136.gcc.rug.nl/>) (van der Zwaag et al., 2009). Las mutaciones patogénicas en *PKP2* son muy numerosas y aparecen distribuidas a lo largo de todo el gen, aunque la mayoría se encuentran en el dominio central de repeticiones armadillo y su efecto no está claro. Las mutaciones localizadas en el dominio N-terminal de la proteína, pueden afectar a la interacción de PKP2 con otras proteínas del desmosoma (Al-Jassar et al., 2013; Hall et al., 2009) (Fig. 4A). La mayoría de las mutaciones conocidas se presentan en heterocigosis y conducen a la producción de proteínas truncadas (Awad et al., 2008; Gerull et al., 2004; Moncayo-Arlandi et al., 2016). De hecho, las mutaciones que generan la aparición de un codón de terminación prematuro en el gen *PKP2*, representan el 70% del total de las mutaciones de *PKP2* identificadas frente a mutaciones con cambio de sentido (Alcalde et al., 2014; van der Zwaag et al., 2009) (Fig. 4B). Los estudios realizados en corazones de pacientes con mutaciones sin sentido de *PKP2*, mostraron una disminución de la expresión de la proteína truncada, con niveles difícilmente detectables.

Por lo tanto, muchas mutaciones de *PKP2* que introducen un codón prematuro de terminación, están asociadas con una disminución de los niveles de dicha proteína, mientras que las mutaciones sin sentido no parecen afectar a la cantidad de la proteína. Es por esto que en la mayoría de los casos, se considera que la haploinsuficiencia de *PKP2* es parte del mecanismo de la enfermedad en la ACM (Rasmussen et al., 2014). A pesar de la importancia de las mutaciones de *PKP2* que generan proteínas truncadas en la epidemiología de la ACM, se conoce poco sobre su patología y sus características moleculares. Estas formas truncadas de *PKP2* podrían interactuar con proteínas estructurales y eléctricas, contribuyendo potencialmente a la patogénesis de la ACM (Moncayo-Arlandi et al., 2016).

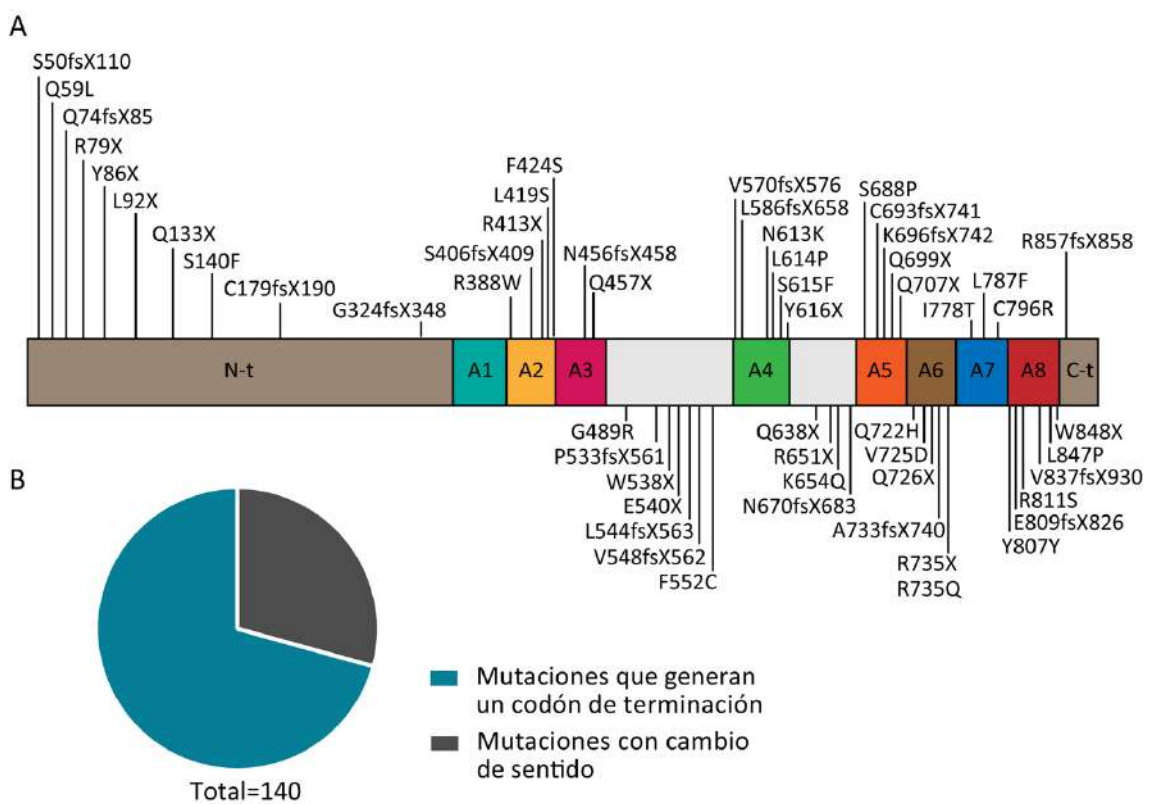


Figura 4. Mutaciones en *PKP2*. **A.** Diagrama lineal del gen *PKP2* con todos los dominios identificados, que muestra la distribución de numerosas mutaciones patogénicas relacionadas con la ACM. N-t: dominio N-terminal; A 1-8: dominios armadillo del 1 al 8; C-t: dominio C-terminal. Adaptado de Awad et al., 2008 y Stevens et al., 2020. **B.** Porcentaje relativo de las mutaciones patogénicas de *PKP2* relacionadas con la ACM, que provocan la aparición de un codón de terminación prematuro (azul) o un cambio de sentido (gris) en la proteína resultante (<https://molgenis136.gcc.rug.nl/>).

4.3. Mutación R735X

Como se mencionó anteriormente, las mutaciones en *PKP2* que generan un codón de terminación prematuro, suelen estar relacionadas con un fenotipo de haploinsuficiencia, ya que la proteína truncada resultante es inestable y se promueve su degradación. Sin embargo, esas mismas mutaciones pueden generar proteínas truncadas lo suficientemente estables para presentar niveles detectables en la célula y que actúen a través de un efecto dominante negativo (Kirchner Florian et al., 2012). Por ello, nos centramos en el estudio de este tipo de mutaciones de *PKP2*, más concretamente en la mutación c.2203C>T, la cual conduce a la aparición de un codón de terminación prematuro en el exón 11, en la posición 735 (p.Arg735*), causando la pérdida de parte de la sexta repetición armadillo (ARM6) hasta el dominio C-terminal (Fig. 5).

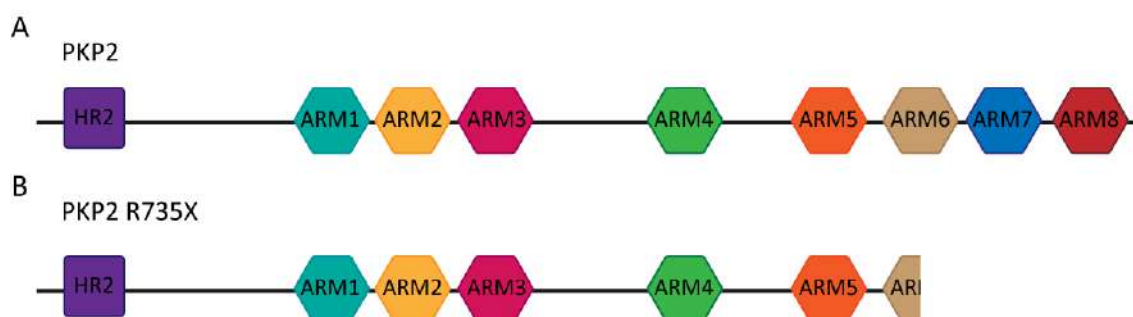


Figura 5. Diagrama de los dominios de PKP2. **A.** Representación de la secuencia de PKP2 “wild-type”: dominio HR2 y 8 dominios armadillo (ARM1-8). **B.** Representación la secuencia del truncado de PKP2: R735X. La mutación R735X genera un codón de parada prematuro que causa la pérdida de parte del dominio armadillo 6 (ARM6) en adelante. Adaptado de Alcalde et al., 2014.

Esta mutación se ha descrito en distintos estudios en pacientes afectados por la ACM, que presentaban síncope, disfunción del ventrículo derecho, alteraciones estructurales, repolarización anormal, arritmias ventriculares e historial familiar de muerte súbita cardíaca (Alcalde et al., 2015; Bao et al., 2013; Gerull et al., 2004) (Tabla 2).

| Estudio | Cohorte | Nº Pacientes | Mutaciones en <i>PKP2</i> | Mutación R735X | %mutaciones en <i>PKP2</i> | %mutación R735X |
|------------------------|-------------------|--------------|---------------------------|----------------|----------------------------|-----------------|
| (Alcalde et al., 2014) | España | 30 | 13 | 3 | 43,33% | 0,23% |
| (Gerull et al., 2004) | Europa occidental | 32 | 25 | 2 | 78,13% | 0,08% |

| | | | | | | |
|--------------------|-------|----|----|---|--------|--------|
| (Bao et al., 2013) | China | 57 | 40 | 3 | 70,18% | 0,075% |
|--------------------|-------|----|----|---|--------|--------|

Tabla 2. Tabla resumen de los estudios donde aparecen pacientes identificados con la mutación R735X de *PKP2*. Se muestra a qué población pertenece la cohorte, el número de pacientes que la conforman y cuántos de ellos presentan mutaciones en *PKP2* en general y la mutación R735X en particular, tanto en números absolutos como en porcentaje.

4.4. Relación de las mutaciones de *PKP2* con los fenotipos de la ACM

El fenotipo asociado con las mutaciones de *PKP2* parece ser el de la ACM clásica, con afectación principal del ventrículo derecho. Puede haber implicación del ventrículo izquierdo en fases tardías de la enfermedad, pero es mucho menos predominante que en mutaciones en otros genes como *DSG2* o *DSC2* (Awad et al., 2008). Las mutaciones en *PKP2*, desencadenan una sucesión de eventos que pueden conducir a la progresión de la ACM a través de varias rutas (Costa et al., 2020; Delmar & McKenna, 2010) (Fig. 6). Las más descritas son las que provocan defectos electrofisiológicos mediante la alteración de la conexina 43 (Cx43), del canal de sodio $Na_v1.5$, o de la homeostasis del calcio intracelular, que conllevan a la aparición de arritmias (Awad et al., 2008; Cerrone et al., 2012, 2017; Cruz et al., 2015; Green et al., 2019; Noorman et al., 2013; Novelli et al., 2018; Sato et al., 2009; Zhao et al., 2019).

Además de los efectos electrofisiológicos, el déficit de *PKP2* también puede provocar problemas estructurales mediante dos vías principales: el deterioro de la adhesión entre cardiomiocitos y la acumulación fibroadiposa en el miocardio (Lombardi & Marian, 2011). Se ha descrito que la ausencia de *PKP2* o la incorporación de un mutante de *PKP2* en los desmosomas cardiacos, puede perjudicar los contactos entre células, y como consecuencia, interrumpir la conexión entre cardiomiocitos, sobre todo, en respuesta a estrés mecánico (Bass-Zubek et al., 2008; Costa et al., 2020; Gerull et al., 2004; Moncayo-Arlandi et al., 2016). También se ha relacionado la disminución de la expresión de *PKP2*, con una alteración en varias rutas de señalización celular, como las rutas Hippo y Wnt, facilitando la acumulación fibro-adiposa en el desarrollo de la ACM (Chen et al., 2014; Garcia-Gras, 2006; Novelli et al., 2018).

Sin embargo, estudios realizados con pacientes con diferentes mutaciones para *PKP2*, mostraron que la sustitución fibroadiposa, no ocurría en todos los casos, y tampoco se apreció una disrupción entre cardiomiocitos (Gandjbakhch et al., 2018; Rasmussen et al., 2014).

Además, en los modelos de ratón deficientes en PKP2 o de sobreexpresión de mutaciones que generaban proteínas truncadas de PKP2, empleados en diferentes estudios, se hallaron cambios en la función y la estructura del ventrículo derecho, pero no se detectó reemplazo fibroadiposo en ninguno de ellos (Cerrone et al., 2012; Cruz et al., 2015; Leo-Macías et al., 2015; Moncayo-Arlandi et al., 2016). Solamente se ha descrito la presencia de fibrosis cardiaca, en un modelo de ratón con delección de PKP2 específica de corazón, inducible mediante tamoxifeno (Cerrone et al., 2017; Gerull & Brodehl, 2020). Por otra parte, la alteración en la adhesión entre cardiomiocitos, debida a defectos en la integridad de los discos intercalares y de los desmosomas, no está clara y solo se produce en un modelo de ratón transgénico que presenta una alta expresión de un truncado de PKP2 (Gerull & Brodehl, 2020; Moncayo-Arlandi et al., 2016).

De forma novedosa, estudios recientes demuestran que PKP2, junto con RhoA, coordina la organización del citoesqueleto de actina en haces por debajo de la membrana plasmática. Este proceso es fundamental para la translocación de precursores del desmosoma en uniones célula-célula en formación. Por tanto, las alteraciones en la regulación del citoesqueleto que se observan cuando la expresión de PKP2 está comprometida, plantea la posibilidad de que defectos en el citoesqueleto podrían alterar la integridad estructural y la mecanotransducción de los cardiomiocitos, contribuyendo al desarrollo de un fenotipo estructural en la ACM, que previamente se atribuía al deterioro mecánico de las uniones intercelulares (Austin et al., 2019; Godel et al., 2005, 2010).

Todos estos estudios, confirman que PKP2 tiene un papel importante en el desarrollo de la ACM, y la presencia de mutaciones patogénicas conlleva a la aparición de fenotipos complejos, que van desde una enfermedad puramente eléctrica, hasta una enfermedad estructural, caracterizada por disfunción mecánica asociada con arritmias (Fig. 6).

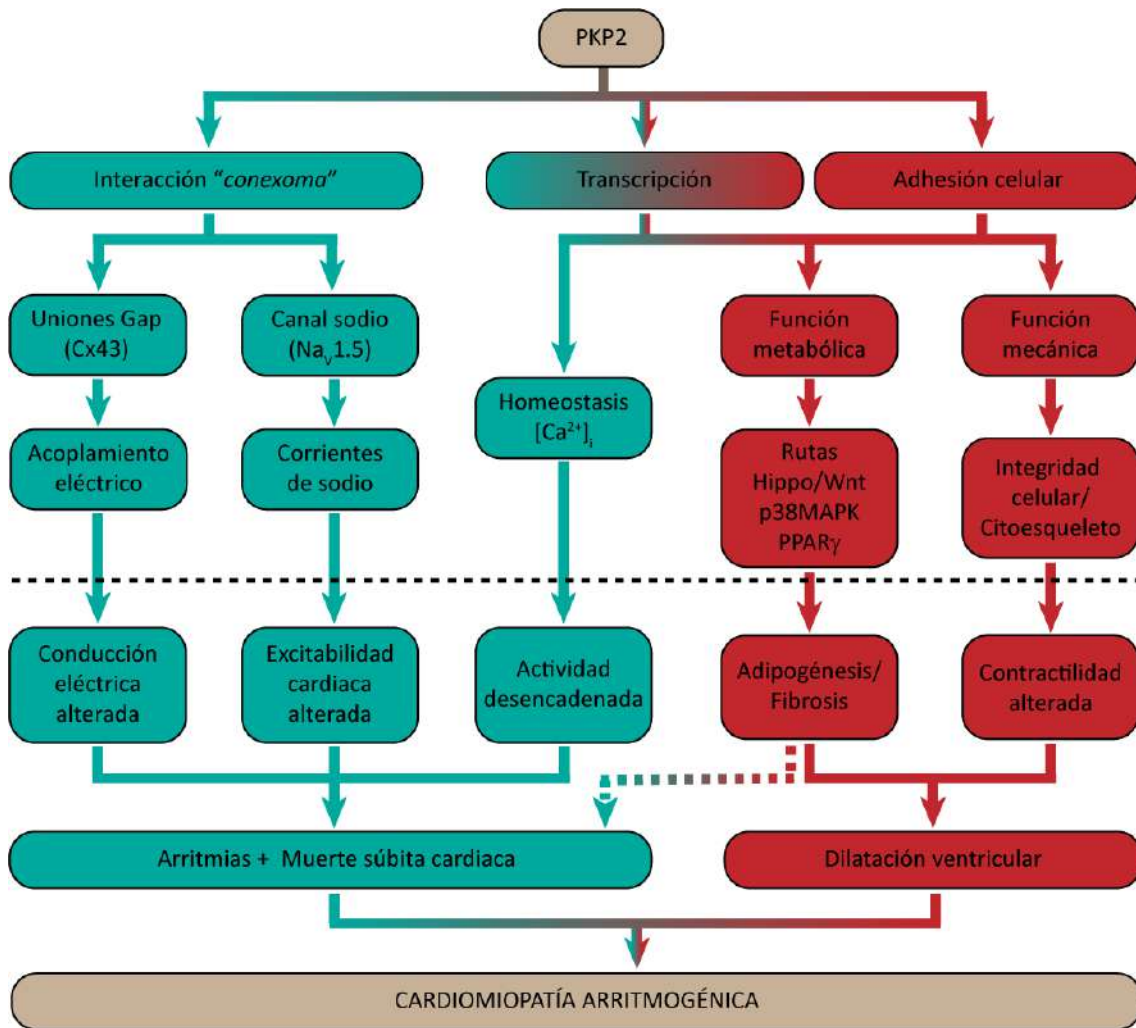


Figura 6. Representación de las funciones de PKP2 en un corazón adulto. PKP2 cubre tres funciones conocidas: interacciona con los componentes del “conexoma”, modula la transcripción y facilita la adhesión celular. Estas funciones son necesarias para un acoplamiento eléctrico y mecánico normal. La presencia de mutaciones en PKP2 (señalado con la línea horizontal discontinua negra) podrían afectar a las funciones eléctricas (azul) y/o estructurales (rojo) del corazón y conducir al desarrollo de la ACM. Adaptado de Cerrone et al., 2019.

5. El citoesqueleto en la patología cardíaca

Durante los últimos años, se ha demostrado que es fundamental conocer las propiedades estructurales y mecánicas del corazón, para comprender las causas y las consecuencias de las cardiomiopatías. Estas propiedades, son determinantes en la función cardíaca general, y el citoesqueleto juega un papel importante en su regulación. El citoesqueleto celular es una red interconectada y dinámica de filamentos que proporciona soporte mecánico y que es esencial para la organización intracelular y el mantenimiento de la forma celular. Está compuesto por

tres tipos principales de polímeros: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Los filamentos del citoesqueleto actúan sinérgicamente con muchas otras proteínas que son necesarias para la formación, organización y funcionamiento del citoesqueleto de actina, entre las que destacan proteínas motoras, como las miosinas (Brito & Sousa, 2020; Pecorari et al., 2020).

La actina es una de las proteínas principales del citoesqueleto en las células eucariotas y juega un papel esencial en varios procesos celulares, incluyendo mecano-resistencia y generación de fuerza contráctil (Koenderink & Paluch, 2018). Hay varias isoformas de actina en los cardiomiocitos. En el sarcómero, los filamentos delgados de actina están formados principalmente por α -actina, y contribuyen activamente a la contracción mediante su interacción con los filamentos gruesos de miosina. Fuera del sarcómero, los filamentos de actina están compuestos por las isoformas citoplasmáticas β y γ , que proporcionan una red de apoyo subcortical, actuando como puentes entre los costámeros y los discos intercalares en la membrana, y los sarcómeros (Dwyer et al., 2012; Grimes et al., 2019; Sit et al., 2019) (Fig. 7). Esto hace, que el citoesqueleto no sarcomérico de los cardiomiocitos, sea fundamental para la función contráctil, la detección de la tensión y la transducción de señales. Sin embargo, se desconoce cómo se regulan los microfilamentos de actina citoplasmática en los cardiomiocitos y cómo puede contribuir a la función cardíaca (Balasubramanian et al., 2010; Grimes et al., 2019).

Otras proteínas claves en la formación y regulación del citoesqueleto, son las miosinas. La superfamilia de las miosinas incluye más de 30 clases de proteínas motoras. Las miosinas interactúan con la actina e hidrolizan el ATP, convirtiendo la energía química en fuerza mecánica para producir tensión y propulsar el deslizamiento de los filamentos de actina en las células eucariotas. Las fuerzas generadas por la miosina sirven para llevar a cabo diversos procesos como la motilidad celular, la citocinesis, el tráfico intracelular, la transducción de señales y la contracción muscular (Brito & Sousa, 2020). La subfamilia de la miosina-2 es el grupo más grande de miosinas, cuyos miembros se denominan "miosinas convencionales", e incluyen miosinas del músculo esquelético, cardíaco y liso, así como a las miosinas no musculares (NMII). Además de estar altamente expresadas en células no musculares, las NMII también están presentes en los tejidos musculares, localizándose en los discos Z y en los discos intercalares, donde se asocian con microfilamentos de actina. Estas interacciones son fundamentales para la miofibrillogénesis y para producir las fuerzas contráctiles necesarias para el mantenimiento de la tensión normal

en los cardiomiocitos (Brito & Sousa, 2020; Dabiri et al., 1997; Fenix et al., 2018; Grimes et al., 2019; Sanger et al., 2006) (Fig. 7).

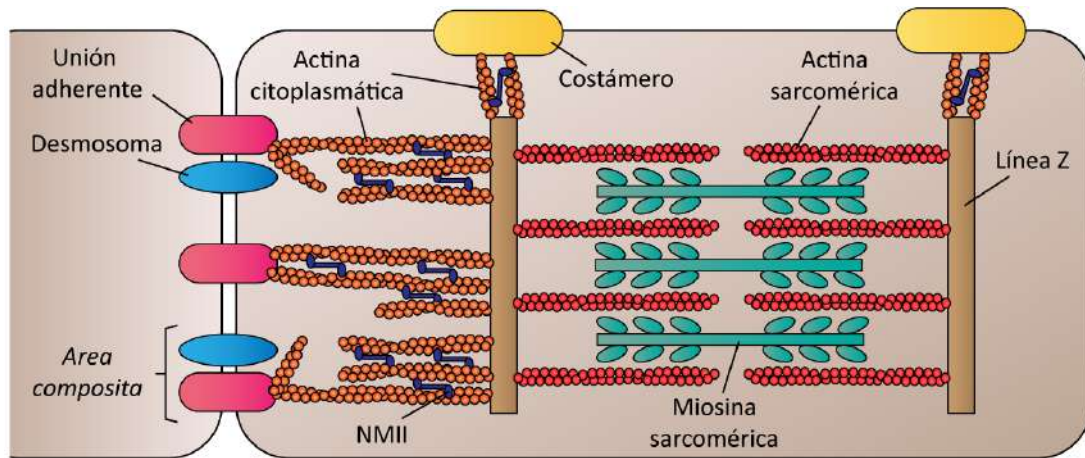


Figura 7. Localización e interacción de las miosinas con los filamentos de actina en el cardiomiocito. Los filamentos de actina citoplasmática y las miosinas no musculares (NMII) sirven como enlace de los sarcómeros a los discos intercalares (mediante el “*area composita*”) y a los costámeros, proporcionando integridad estructural al sarcómero.

Existen tres isoformas de NMII: A, B y C. La isoforma A o NMIIA está codificada por el gen *MYH9* y presenta la cadena pesada CPNMIIA. La isoforma B o NMIIIB está codificada por el gen *MYH10* y su cadena pesada es CPNMIIB. Por último, la isoforma C o NMIIIC está codificada por el gen *MYH14* y presenta la CPNMIIC como cadena pesada. De esta manera, las tres isoformas constan de diferentes cadenas pesadas y comparten cadenas ligeras reguladoras y esenciales (Brito & Sousa, 2020; Newell-Litwa et al., 2015).

La estructura de las NMII es un complejo hexamérico compuesto por dos cadenas pesadas (CPNMII) y cuatro cadenas ligeras: dos reguladoras (CLR) y dos cadenas ligeras esenciales (CLE). Este complejo se puede dividir estructuralmente en tres regiones: el dominio motor, el dominio del cuello y el dominio de la cola. El dominio motor incluye los sitios de unión del ATP y de la actina, preferentemente a las isoformas citoplasmáticas β y γ . Las cadenas ligeras se asocian con las cadenas pesadas en el dominio del cuello. La región C-terminal de las CPNMII, que constituye la cola, es particularmente importante para la correcta localización subcelular de las diferentes isoformas de las NMII. En contraste con el dominio motor, que se encuentra muy conservado, la cola es variable y única para cada miosina, determinando funciones específicas en las células.

Existen múltiples mecanismos que regulan la actividad de las NMII y su localización subcelular. Cuando las CLR no están fosforiladas, se promueve la interacción intramolecular entre el dominio de la cola y el dominio motor, generando una estructura compacta y provocando la

inactivación de la molécula NMII (Fig. 8A). La activación e inactivación se regulan principalmente a través de la fosforilación o desfosforilación de las CLR en residuos de Ser, Thr y Tyr, siendo la activación más importante la que se produce tras la fosforilación de las CLR en la Ser 19, mediada por la vía calcio-calmodulina- kinasa de la cadena ligera de miosina (KCLM). En su conformación activa, las colas de las NMII interactúan de manera antiparalela y se asocian entre ellas en filamentos bipolares que se entrecruzan y empujan los filamentos de actina entre sí, creando diferentes mallas de haces de actomiosina (Betapudi, 2014, 2014; Brito & Sousa, 2020; Fenix & Burnette, 2018; Newell-Litwa et al., 2015; Sellers & Heissler, 2019) (Fig. 8B).

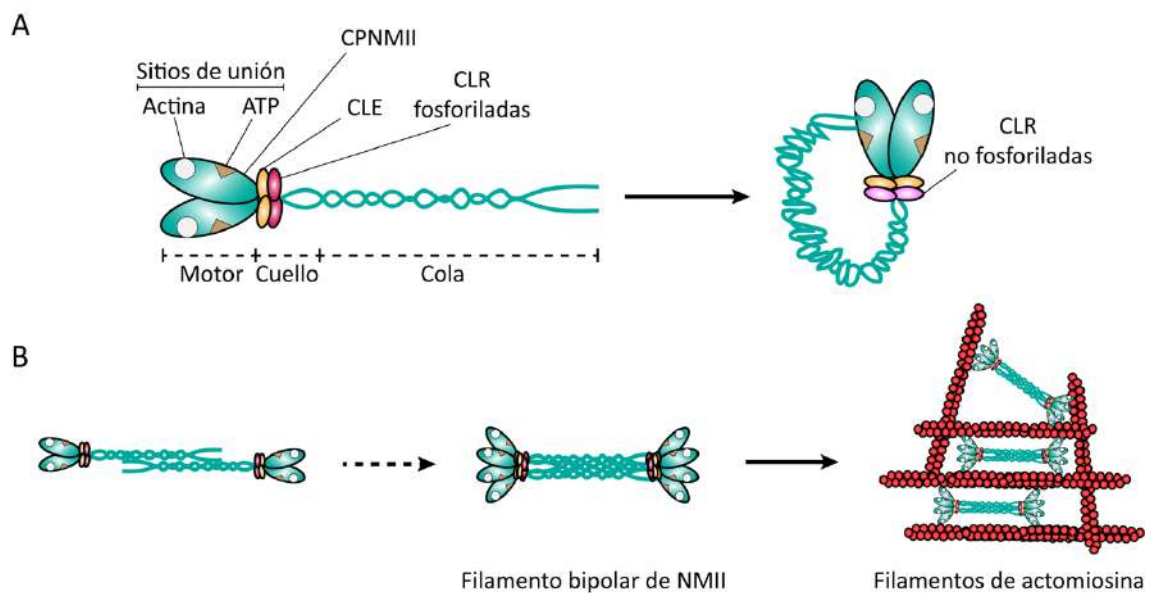


Figura 8. Miosinas NMII. A. Estructura de las NMII en su forma activa con las CLR fosforiladas. La desfosforilación de las mismas provoca la inactivación de las NMII y su cambio de conformación a una forma más compacta. B. Mecanismo de ensamblaje de las NMII y unión a los filamentos de actina.

Por tanto, las proteínas del citoesqueleto como actina y miosinas son fundamentales para el establecimiento y mantenimiento adecuados de los sarcómeros cardíacos y una desregulación de estas proteínas puede afectar a la función cardíaca y conducir al desarrollo de cardiomiopatías (Grimes et al., 2019; van der Velden & Stienen, 2019).

Objetivos

El propósito general de esta tesis es entender los mecanismos patológicos de la cardiomiopatía arritmogénica (ACM) inducidos por deleciones en la región C-terminal de la proteína PKP2, que se encuentran frecuentemente en pacientes que sufren esta enfermedad. Los objetivos específicos de esta tesis se resumen en:

1. Caracterizar la mutación R735X.
2. Identificar y caracterizar mecanismos de inducción del fenotipo estructural relacionado con la ACM, provocado por la mutación R735X.
3. Identificar dianas terapéuticas en la ACM.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Plásmidos

1.1. Generación del mutante R735X

La secuencia del gen de la *placofilina-2* (*PKP2*) se adquirió en la casa comercial GeneCube. Con el objetivo de generar una versión truncada de la proteína, a la que nos referiremos a partir de ahora como R735X, se introdujo un codón de parada en el aminoácido 735 de la secuencia “*wild type*” mediante PCR.

1.2. Generación de las proteínas de fusión

La secuencia *PKP2* completa y su versión truncada R735X, se clonaron en el plásmido *pEGFP-C1* (Clontech) para generar plásmidos que codificaban las proteínas de fusión EGFP-*PKP2* y EGFP-R735X, quedando la EGFP en el dominio N-terminal de la proteína. La secuencia R735X se clonó en el plásmido *pEGFP-N1* (Clontech) para generar un plásmido que codificaba la proteína de fusión R735X-EGFP (R735X-Ctag), quedando la EGFP en el dominio C-terminal de la proteína (Tabla 3).

1.3. Generación de *shPKP2*

Para llevar a cabo experimentos de silenciamiento del gen de *PKP2*, se utilizaron los plásmidos lentivirales GIPZ shRNA (ARN de horquilla corta) de Dharmacom™ (Tabla 3).

1.4. Generación de líneas celulares estables

Para generar líneas celulares estables, las secuencias *PKP2*, *R735X*, *EGFP-PKP2*, *EGFP-R735X* y *R735X-EGFP* se clonaron en un vector de transposón “*piggyBac*” (PB). Tanto el vector PB como el de la enzima transposasa fueron generosamente proporcionados por el Dr. Allan Bradley (Instituto Sanger). Los detalles de cada construcción se muestran en la Tabla 3.

1.5. Generación plásmidos para la producción de virus adeno-asociados (AAV)

Para la generación de los plásmidos que se utilizan para la producción de los virus adeno-asociados (AAV), las secuencias de *PKP2*, *R735X*, *EGFP-PKP2*, *EGFP-R735X*, *R735X-EGFP* (R735X-

Ctag) y *shPKP2* se clonaron en un vector bajo el promotor cardiaco cTnT (Troponina T) que se encuentra flanqueado por las secuencias ITR (repeticiones terminales invertidas) (Tabla 3).

| Plásmido | Referencia | Características | Uso |
|--------------------------------------|------------------|---|---|
| <i>pCAG-PPK2</i> | | | Transfección transitoria en células HEK293T |
| <i>pCAG-R735X</i> | | Introducción de un codón de parada en el aminoácido 753 de la secuencia de <i>PKP2</i> . | Transfección transitoria en células HEK293T |
| <i>pCMV-EGFP-PPK2</i> | | Clonaje de la secuencia <i>PKP2</i> en el plásmido <i>pEGFP-C1</i> (Clontech) | Transfección transitoria en células HEK293T |
| <i>pCMV-EGFP-R735X</i> | | Clonaje de la secuencia <i>R735X</i> en el plásmido <i>pEGFP-C1</i> (Clontech) | Transfección transitoria en células HEK293T |
| <i>pCMV-R735X-EGFP</i> (R735X-Ctag) | | Clonaje de la secuencia <i>PKP2</i> en el plásmido <i>pEGFP-N1</i> (Clontech) | Transfección transitoria en células HEK293T |
| <i>pPB-CAG-∅</i> (vector vacío) | Instituto Sanger | | Transfección transitoria en células HEK293T |
| <i>pEGFP-N1</i> | 6085-1, Clontech | | Transfección transitoria en células HEK293T |
| pEF5-FRT-V5-DEST-GFP-Kif26b | 102862, Addgene | | Transfección transitoria en células HL-1 |
| <i>pPB-CAG-PPK2-PGK-Neomicina</i> | | Clonaje de la secuencia <i>PKP2</i> en un vector de transposón PB y con selección por Neomicina | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pCAG-R735X-PGK-Neomicina</i> | | Clonaje de la secuencia <i>R735X</i> en un vector de transposón PB y con selección por Neomicina | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pCAG-R735X-EGFP-PGK-Neomicina</i> | | Clonaje de la secuencia <i>R735X-EGFP</i> (<i>R735X-Ctag</i>) en un vector de transposón PB y con selección por Neomicina | Líneas estables en células HL-1 |

| | | | |
|--|---------------------|--|--|
| <i>pCAG-EGFP-PKP2-PGK-Neomicina</i> | | Clonaje de la secuencia <i>EGFP-PKP2</i> en un vector de transposón PB y con selección por Neomicina | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pCAG-EGFP-R735X-PGK-Neomicina</i> | | Clonaje de la secuencia <i>EGFP-R735X</i> en un vector de transposón PB y con selección por Neomicina | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pPB-Ubc-EGFP-PGK-Neomicina</i> | | Clonaje de la secuencia <i>EGFP</i> en un vector de transposón PB y con selección por Neomicina | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pCMV-Transposasa</i> | Instituto Sanger | | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pCMV-tGFP-Ires-Puromicina-shPKP2</i> | Dharmacon™ | | Líneas estables en células HL-1 |
| <i>pAAV-cTnT-PKP2-Ires-EGFP</i> | (Cruz et al., 2015) | Clonaje de la secuencia <i>PKP2</i> en un vector de AAV bajo el promotor cardiaco cTnT | Producción de AAV para inyectar animales |
| <i>pAAV-cTnT-R735X-Ires-EGFP</i> | (Cruz et al., 2015) | Clonaje de la secuencia <i>R735X</i> en un vector de AAV bajo el promotor cardiaco cTnT | Producción de AAV para inyectar animales |
| <i>pAAV-cTnT-EGFP-PKP2</i> | | Clonaje de la secuencia <i>EGFP-PKP2</i> en un vector de AAV bajo el promotor cardiaco cTnT | Producción de AAV para inyectar animales |
| <i>pAAV-cTnT-EGFP-R735X</i> | | Clonaje de la secuencia <i>EGFP-R735X</i> en un vector de AAV bajo el promotor cardiaco cTnT | Producción de AAV para inyectar animales |
| <i>pAAV-cTnT-R735X-EGFP (R735X-Ctag)</i> | | Clonaje de la secuencia <i>R735X-EGFP</i> en un vector de AAV bajo el promotor cardiaco cTnT | Producción de AAV para inyectar animales |
| <i>pAAV-cTnT-EGFP-Ires-Luciferasa-shPKP2</i> | | Clonaje de la secuencia <i>shPKP2</i> del plásmido lentiviral en un vector de AAV bajo el promotor cardiaco cTnT | Producción de AAV para inyectar animales |

Tabla 3. Lista de plásmidos empleados para transfectar células de forma transitoria, para generar líneas celulares estables y para producir AAV para experimentos en animales.

2. Clonaje

Todos los plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes (New England Biolabs) y separados por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de restricción de interés se purificaron usando *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN se ligaron usando el kit comercial *Quick-Stick Ligase* (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto resultante de la ligación se transformó en bacterias competentes *Escherichia coli* (E.coli) Stbl3 (Invitrogen, C737303) siguiendo el siguiente protocolo: tras una incubación de 30 minutos en hielo, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 45 segundos a 42°C y se dejaron enfriar en hielo 2 minutos. Posteriormente, se añadió medio de cultivo LB (Luria Bertani) y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente a las siguientes concentraciones: ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 30 µg/ml.

De cada placa se picaron colonias individuales y se crecieron en medio LB con antibiótico, a 37°C en agitación durante 16h. El ADN plasmídico se aisló de los cultivos líquidos usando el kit comercial *NucleoSpin Plasmid Easypure mini kit* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se comprobaron mediante cortes con enzimas de restricción y por secuenciación (Secugen).

Los plásmidos se amplificaron en 250 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente. Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico usando el kit comercial *NucleoBond Xtra Maxi kit* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3. Cultivos celulares

3.1. Células HEK293T

3.1.1. Cultivo

La línea celular HEK293T son células embrionarias de riñón humanas que contienen el antígeno SV40 T. Estas células se mantuvieron en medio DMEM (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina. Las células se cultivaron en placas p150 y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de

CO₂. Se mantuvieron como monocapa y se realizaron pases dos o tres veces a la semana cuando alcanzaban el 90-100% de confluencia.

3.1.2. Transfección

Para realizar transfecciones transitorias, las células HEK293T al 70% de confluencia, se incubaron 16h con una mezcla del ADN plasmídico y PEI (Polyethylenimine, Linear, MW 25000, Polysciences, 23966-1) en un ratio 1:3 (w/v) con medio DMEM sin FBS. A la mañana siguiente se cambió el medio por medio completo. Las células se recogieron para su posterior análisis transcurrido 48 horas desde la transfección.

3.2. Células HL-1

3.2.1. Cultivo

La línea celular HL-1 deriva de cardiomiocitos auriculares de ratón que mantienen la habilidad de contraerse y conservan características fenotípicas de cardiomiocitos adultos. Para su mantenimiento en cultivo, se empleó medio Claycomb (Sigma-Aldrich) suplementado con 100 µM de norepinefrina (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina y se cultivaron en placas pretratadas con 0,02% de gelatina/fibronectina (Sigma-Aldrich). Las células HL-1 se mantuvieron como monocapa y se realizó un pase cada dos días cuando alcanzaban el 100% de confluencia, usando 0,05% de tripsina/EDTA. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

3.2.2. Transfección

Para realizar transfecciones transitorias, las células HL-1 al 60-70% de confluencia, se incubaron durante 16h con la mezcla del ADN plasmídico y el reactivo JetPRIME® (Polyplus transfection®, 114-07) en un ratio 1:3 (w/v) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Obtención de líneas celulares estables

Para generar líneas estables de HL-1, se utilizó el sistema de transposón “*piggyBac*” (PB). Las células se transfectaron con los plásmidos PB que codificaban las proteínas PKP2, R735X, EGFP-PKP2, EGFP-R735X, R735X-EGFP o EGFP, junto con el plásmido que codificaba la enzima transposasa en un ratio 5:1 (w/w). 48 horas después de la transfección, se inició la selección de

las células añadiendo al medio del cultivo 300 ng/ml de G418 (Neomycin, Merck, G8168) durante 10 días. Posteriormente, se expandieron las nuevas líneas generadas.

Para generar la línea estable de HL-1 de silenciamiento del gen *PKP2*, se utilizaron vectores lentivirales con cada uno de los plásmidos GIPZ shRNA. Con los virus generados se infectaron células HL-1 con una MOI (del inglés “*multiplicity of infection*”) de 100. Tras 48 de infección, se inició la selección de las células añadiendo al medio de cultivo 2 µg/ml de puomicina (Sigma-Aldrich) durante 10 días. Posteriormente, se expandieron las nuevas líneas generadas. Por último, se comprobó mediante qPCR, el nivel de expresión de *PKP2* de cada una de las líneas celulares, y se eligió aquella en la que había un 80% de silenciamiento de la expresión de *PKP2*.

3.2.4. Tratamiento con compuestos específicos

Sobre las líneas estables de HL-1 que expresaban *PKP2* o R735X se emplearon compuestos específicos que modificaban la función de la MYH10. Estos compuestos son: 4-Hidroxiacetofenona (4-HAP) (804311, Sigma-Aldrich) y Blebistatina (203391, Sigma-Aldrich). Para ello, se cultivaron las células a un 60% de confluencia y se añadieron ambos compuestos a una concentración de 5 µm. Las células se incubaron con los compuestos durante 16 horas y posteriormente, se recogieron para realizar diferentes experimentos.

4. Producción de vectores virales

Todas las producciones se generaron en colaboración con la unidad de vectores virales del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

4.1. Producción de lentivirus

Para generar lentivirus, los plásmidos lentivirales GIPZ shRNA para el silenciamiento del gen de *PKP2*, se transfectaron junto con los plásmidos de empaquetamiento, *psPAX2* (plásmido que contiene los genes Gag, Pol, Rev y Tat) y *pMD2.G* (plásmido de envoltura que expresa VSV-G) en células HEK293T con fosfato cálcico. Tras 48 horas, se recogieron los sobrenadantes, se filtraron con filtro de 0,45 µm (SLHA03SS, Millipore) y se ultracentrifugaron (2h 4°C 26000 rpm) para concentrar las partículas lentivirales, que se resuspendieron finalmente en PBS.

La titulación se determinó infectando células HEK293T con diluciones seriadas de los lentivirus. Después de 48 horas de infección, se analizó por citometría de flujo la expresión de GFP. La titulación obtenida fue de alrededor de 10^8 TU/ml.

4.2. Producción de virus adeno-asociados (AAV)

Todos los plásmidos *pAAV-cTnT* generados en el laboratorio, se usaron para producir virus adeno-asociados de serotipo 9 (AAV9) por ser la variante que más tropismo muestra por el tejido cardiaco. Para ello, se transfectaron dichas construcciones junto con el plásmido *pDG9*, que contiene los genes Rep, Cap y todos los genes “*helper*” adenovirales, en células HEK293T con PEI. Después de 72 horas, se recogieron las células, se centrifugaron y se lisaron para extraer las partículas virales. Se purificaron en gradiente de iodixanol (condiciones 50000 rpm 16°C 3h) y la fracción obtenida se concentró mediante centricones (UFC910096, Millipore). Los virus obtenidos se resuspendieron en PBS con 0,001% de pluronic (24040032, ThermoFisher).

La titulación de los AAVs se determinó por qPCR (Scherr et al., 2001).

5. Animales

Los estudios se llevaron a cabo con ratones C57BL/6J de laboratorios Charles River. Los ratones se alojaron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

Los ratones se mantuvieron libres de parásitos específicos y bajo condiciones controladas de luz (ciclo luz-oscuridad de 12 horas), presión y temperatura ($22 \pm 0,8^\circ\text{C}$), permitiéndoles el acceso *ad libitum* de comida y agua. Para el mantenimiento, se empleó una dieta estándar proporcionada por labdiet®.

Todos los procedimientos realizados como parte del trabajo experimental con animales han sido aprobados previamente por el comité ético del CNIC (PROEX 019/17). Su mantenimiento y todos los protocolos de manipulación se realizaron de acuerdo con la legislación española sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1386/2018).

5.1. Inyección de AAV

La administración sistémica de los vectores AAV9 en ratones adultos (3-4 semanas) se realizó mediante inyección intravenosa en la cola. Se inyectaron 1×10^{11} PV/ml. Todos los experimentos se realizaron a partir de las 4 semanas después de la inyección del AAV (Cruz et al., 2015).

5.2. Aislamiento de cardiomiocitos

Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina. Los corazones se extirparon rápidamente, se canularon con una aguja roma de 21g y se conectaron a un aparato de perfusión Langerdorff. Después se perfundieron a 37°C con un flujo de 1 ml/min durante 5 minutos con solución de perfusión (Tabla 4). A continuación, los corazones se perfundieron durante 20 minutos manteniendo el mismo flujo constante con la solución de digestión (Tabla 4). Tras la digestión el corazón se depositó sobre una placa con 2,5 ml de solución de digestión y el tejido se disgregó mecánicamente al pasarlos por una pipeta de transferencia estéril de plástico. La suspensión celular fue filtrada con una malla de nylon de 200 μm en un tubo falcon de 15 ml y se añadieron 10 ml de la primera solución de inactivación de la digestión (Tabla 4). Las células se dejaron decantar por gravedad durante 30 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante. A continuación, se repitió este paso con la segunda solución de inactivación de la digestión (Tabla 4). Por último, las células se incubaron 20 minutos con la segunda solución de inactivación de la digestión con dos concentraciones crecientes de CaCl_2 hasta una concentración final de 1 mM.

| Solución | Composición |
|---|--|
| Perfusión | 113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,6 mM KH_2PO_4 , 12 mM NaHCO_3 , 0,6 mM Na_2HPO_4 , 0,032 mM rojo fenol, 10 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES, 30 mM taurina, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5 mM glucosa y 10 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM) a pH 7,46 |
| Digestión | Solución de perfusión + 12,5 μM CaCl_2 , 0,14 mg/ml tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,005 U/ml DNAsa (Sigma) y 0,2 mg/ml Liberasa (Roche Diagnostics) |
| Inactivación de la digestión 1 | Solución de perfusión + 10% de suero fetal bovino y 12,5 μM CaCl_2 |
| Inactivación de la digestión 2 | Solución de perfusión + 5% de suero fetal bovino y 12,5 μM CaCl_2 |
| Inactivación de la digestión 2 modificado 1 | Solución de inactivación de la digestión 2 + 100 μM CaCl_2 |
| Inactivación de la digestión 2 modificado 2 | Solución de inactivación de la digestión 2 + 1 mM CaCl_2 |

Tabla 4. Lista de las soluciones empleadas en la extracción de cardiomiocitos junto con sus respectivas composiciones.

5.3. Imagen cardiaca por resonancia magnética (MRI)

Las MRI cardiacas se realizaron en la unidad de imagen avanzada del CNIC mediante un sistema de resonancia magnética Agilent VNMRS DD1 7T (Santa Clara, California, EE.UU.). Después de la optimización del sistema, se obtuvieron imágenes de cuatro cámaras y de dos cámaras del corazón, que se usaron para planificar la secuencia del eje corto. Las imágenes del corazón en el eje corto se tomaron de forma secuencial desde el ápex hasta las válvulas en 12 secciones de 0,8 mm cada una y se analizaron cuantitativamente con el programa Segment (MEDVISO). Para ello, se marcó manualmente el endocardio (excluyendo los músculos papilares) y el epicardio del ventrículo izquierdo y el endocardio del ventrículo derecho en cada una de las 12 imágenes del eje corto. Se obtuvieron los valores para los parámetros de la fracción de eyección (EF-%), el volumen sistólico final (ESV- μ l), el volumen diastólico final (EDV- μ l) y el volumen sistólico (SV- μ l) de ambos ventrículos.

5.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía electrónica de transmisión de la unidad de microscopía de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Para ello las muestras de corazón se fijaron con una solución de cacodilato con 4% formaldehído y 1% glutaraldehído y posteriormente se pasaron a una solución 1% tetróxido de osmio. A continuación, las muestras se lavaron con PBS y se deshidrataron en soluciones de etanol en porcentajes crecientes y finalmente en acetona. Posteriormente fueron infiltrados con resina Fluka Durcupan-ACM y polimerizados a 60°C durante 48 horas. Después, se realizaron cortes seriados en secciones de 60-70 nm con un ultramicrotomo, que se montaron sobre rejillas de malla-200. Las secciones se tiñeron con una solución al 2% de acetato de uranilo durante 10 minutos, seguido de una tinción con citrato de plomo durante 10 minutos. Las secciones se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 (Tokio, Japón) que funciona a 100 kV. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital GATAN (Orius 200SC).

El programa de procesamiento de las imágenes fue el Imagen J. Sobre cada sarcómero se marcaron las dos bandas Z y se midió la distancia entre ellas, tanto en sarcómeros relajados

como en contraídos. De esta manera se determinó el tamaño de los sarcómeros, siendo esta una medida para especificar el grado de contracción de los mismos.

5.5. Inmunohistoquímica (IHQ)

Las muestras de corazón se fijaron en formol tamponado al 10% durante 48 horas a temperatura ambiente. A continuación las muestras se procesaron para su inclusión en parafina en un procesador de muestras (Leica ASP300). Posteriormente se realizaron cortes seriados en secciones de 4 μm en un microtomo (Leica RM2245) que se colocaron en portaobjetos polarizados. La desparafinación, hidratación y recuperación antigénica, se llevó a cabo de manera automatizada mediante el equipo Dako PTLINK (Dako). Después se realizó el bloqueo de las secciones, con 10% de FBS en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario de GFP (R1091P, Acris Antibodies) a una dilución 1:600. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario conejo anti-cabra a una dilución 1:200 (P0449, Dako) y con el polímero anti-conejo marcado con HRP Dako EnVision (K4003, Dako). Por último, las muestras se revelaron con substrato DAB y se contratiñeron con hematoxilina (Dako). Todas las muestras fueron digitalizadas y analizadas con el programa NDP view2.

Este procedimiento se llevó a cabo en la unidad de histopatología del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

6. Inmunofluorescencia

6.1. Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos extraídos se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos. A continuación se añadió una solución de bloqueo y permeabilización (Reactivo de bloqueo TSA FP1012, PerkinElmer) con 0,1% Tritón X-100 (T9284, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios a una dilución 1:200. Tras lavar dos veces con PBS, los cardiomiocitos se incubaron con los anticuerpos secundarios a una dilución 1:500 y/o con Faloidina a una dilución 1:1000, durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron dos veces con PBS y finalmente, los cardiomiocitos se montaron en los portaobjetos con medio de montaje Mowiol (Mowiol 4-88, Glicerol, 200 mM Tris-HCl pH 8,5 and 2,5% 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]-octano). La lista de los anticuerpos utilizados aparece descrita en la Tabla 5.

6.2. Células HL-1

Las células se cultivaron sobre placas de cultivo a una densidad de $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ y se mantuvieron 24 horas en cultivo. Después se fijaron con 4% de PFA durante 15 minutos. Tras lavar con PBS, se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con 10% NGS (suero de cabra) y 0,1% Tritón X-100 en PBS (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos 1:200 en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras lavar con 0,1% Tritón X-100 en PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios con una dilución 1:500 en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS, y posteriormente para el marcaje de la actina, las células se incubaron con una dilución 1:1000 de faloidina en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con 0,1% Tritón X-100 en PBS, las muestras se montaron con medio de montaje Mowiol.

En los experimentos donde únicamente se marcó la actina, las células se incubaron con la faloidina tras la permeabilización y bloqueo, siguiendo el protocolo anterior. Después de lavar con 0,1% Tritón X-100 en PBS, se incubaron con DAPI diluido 1:1000 en PBS, previo al montaje con Mowiol. Los detalles de los anticuerpos empleados se encuentran recogidos en la Tabla 5.

| Anticuerpo | Origen | Referencia |
|---------------------------------------|--------|---------------------|
| Anti-GFP | Pollo | GFP-1010, Aves Labs |
| Anti-MYH9 | Conejo | GTX113236, GeneTex |
| Anti-MYH10 | Ratón | GTX634160, GeneTex |
| Anti-PKP2 | Ratón | 651101, Progen |
| Alexa fluor 488 anti-pollo IgY (H+L) | Cabra | A32931, Invitrogen |
| Alexa fluor 647 anti-conejo IgG (H+L) | Cabra | A32733, Invitrogen |
| Alexa fluor 405 anti-ratón IgG (H+L) | Cabra | A31553, Invitrogen |
| Alexa fluor 488 anti-ratón IgG (H+L) | Cabra | A11029, Invitrogen |
| Alexa fluor 568 anti-ratón IgG (H+L) | Cabra | A11031, Invitrogen |
| Phalloidin-iFluor 594 | - | ab176757, Abcam |
| DAPI | - | 62248, ThermoFisher |

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios y compuestos marcados con fluorocromos, empleados para las inmunofluorescencias, en células HL-1 y en cardiomiocitos aislados.

Las imágenes de todas las inmunofluorescencias se adquirieron en un microscopio confocal Leica SP8 con un objetivo de inmersión 63x o 100x.

7. Análisis de las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias

7.1. Ratio intensidad de membrana-citoplasma

Se tomaron imágenes *z-stacks* (o imágenes seriadas en el eje z) de las inmunofluorescencias de células HL-1 que expresaban de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o R735X-EGFP, con 10 planos de 0,5 μm cada uno, con un objetivo 63x (HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL) y una amplificación de 2. Las imágenes se analizaron con el programa Image J. Para ello, se realizaron las proyecciones máximas de los 10 planos de cada imagen y sobre ellas, se dibujaron regiones de interés (ROIs) definiendo la membrana plasmática y el citoplasma, excluyendo el núcleo y grandes vacuolas de cada célula. Posteriormente, se obtuvo la intensidad del EGFP en la membrana plasmática y en el citoplasma de cada célula y se calculó el ratio de la intensidad membrana/citoplasma.

7.2. Perfiles de intensidad de los elementos de actomiosina en HL-1

Se tomaron imágenes por microscopía confocal de las inmunofluorescencias de células HL-1 que expresaban de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o R735X-EGFP (R735X-Ctag) frente a PKP2, MYH9, MYH10 y actina con un objetivo 100X (HC PL APO CS2 100x/1.40 OIL) y con una amplificación de 7. Con el programa Image J se analizó la distribución de PKP2, MYH9, MYH10 y actina, trazando una línea de 6 μm sobre la membrana plasmática desde el espacio extracelular hacia el citoplasma y adquiriendo los perfiles de intensidad de cada una de las proteínas. Los picos máximos de intensidad de los perfiles de las cuatro proteínas se identificaron y se midió la distancia relativa entre PKP2 y el resto de proteínas.

7.3. Número y longitud de ramificaciones en la estructura de las miosinas 9 y 10

Se realizó una inmunofluorescencia de MYH9 y MYH10, en células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2, R735X o R735X-EGFP. Se tomaron imágenes con un objetivo 63x (HC PL APO CS2 100x/1.40 OIL) con una amplificación de 2. Estas imágenes se analizaron usando el complemento para Image J, "*Skeleton*", con el cual, se midieron el número y la longitud de las ramificaciones presentes en la estructura del citoesqueleto que conformaban ambas miosinas.

7.4. Tinción de faloidina en HL-1: cantidad de filamentos de actina sobre la región del núcleo y altura de las células

Se tomaron imágenes *z-stacks* en el microscopio confocal de las inmunofluorescencias de células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2, R735X o R735X-EGFP marcadas con faloidina y DAPI, desde la base de las células hasta la parte superior del núcleo con un objetivo 63x (HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL) y una amplificación de 2. El número de planos varió según el tamaño de la célula pero se mantuvo un grosor constante de 0,2 μm cada uno.

Para cuantificar el porcentaje de filamentos que presentaban las células sobre el núcleo, se usó el programa Image J. De las imágenes *z-stacks*, se seleccionaron los planos que quedaban por encima del núcleo, se realizó la proyección máxima de los mismos y se midió la intensidad de la tinción de faloidina.

Para medir la altura de las células, se tuvieron en cuenta la cantidad de planos de cada imagen *z-stacks* y el tamaño de cada plano (0,2 μm) y para la visualización, se realizaron proyecciones máximas transversales de las imágenes *z-stacks*.

7.5. Distribución de las miosinas 9 y 10 en cardiomiocitos

Se realizó una inmunofluorescencia en cardiomiocitos aislados de ratones inyectados con pAAV-*PKP2* y pAAV-*R735X* de MYH9 y MYH10 juntas. Se tomaron imágenes en el microscopio confocal con un objetivo 100x (HC PL APO CS2 100x/1.40 OIL) con una amplificación de 7. Estas imágenes se analizaron usando el complemento para Image J, "DiAna". Para ello, se procesaron usando un filtro Gaussiano con un valor de radio 1. Posteriormente, los objetos contenidos en la imagen se segmentaron en función de su tamaño, eliminando objetos de los bordes de la imagen. Después de la colocalización, se realizó el análisis de la distancia de centro a centro y del porcentaje de volumen de colocalización entre MYH9 y MYH10. La MYH9 fue usada como referencia.

7.6. Tinción de faloidina en cardiomiocitos: perfiles de intensidad y direccionalidad de los sarcómeros

Se tomaron imágenes con microscopio confocal de las inmunofluorescencias con faloidina de cardiomiocitos aislados de ratones inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X*, AAV-*R735X-EGFP* y AAV-*shPKP2*, con objetivo 100X (HC PL APO CS2 100x/1.40 OIL) y con una amplificación de 7.

Con el programa Image J, se analizó el patrón de tinción de la faloidina, trazando una línea de longitud constante sobre los cardiomiocitos y adquiriendo los perfiles de intensidad.

El patrón de la tinción de faloidina también se utilizó para medir la orientación de los sarcómeros en los cardiomiocitos. Para ello, se empleó el complemento “*Directionality*” del programa Image J y se analizó el parámetro dispersión (desviación estándar σ).

8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los experimentos de AFM se llevaron a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Ricardo García del Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid (ICMM).

Se utilizaron células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2, R735X o R735X-EGFP cultivadas en placas p35 (35 mm) a una confluencia del 60-70%. Los experimentos de AFM se realizaron con un instrumento comercial (JPK NanoWizard® 3 NanoScience AFM, JPK Instruments AG, Berlin, Germany) montado en un microscopio invertido Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Los estudios de células se llevaron a cabo usando sondas especialmente adaptadas para células grandes (Biotool Cell XXL, NanoandMore, Alemania) con una altura de 15 μm . La sonda se mantenía en contacto con la superficie de la muestra y se movía con gran precisión en el eje XY gracias a un escáner piezoeléctrico. El cambio de dirección de la sonda era seguido mediante un láser que era reflejado sobre un fotodetector, el cual permitía detectar sus movimientos verticales con una precisión subnanométrica. Se generaron mapas de fuerza-volumen para células completas, adquiriendo curvas de fuerza-distancia en un área de 30 μm^2 . Para evitar daños a la muestra, la fuerza máxima que se aplicó a las células fue de 2 nN. Los mapas se analizaron con un programa escrito en Python.

9. Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)

Para los experimentos de FRET, se adquirió el plásmido Actina-cpstFRET-Actina (AcpA), un sensor FRET que responde a fuerza o tensión. Esta construcción contenía en tándem YFP/Venus y CFP/Cerulean y dos moléculas de actina, una en el C-terminal y la otra en el N-terminal de la construcción cpstFRET (80643, Addgene). A partir de este plásmido, se generaron otras dos construcciones que no respondían a tensión. Para la primera, cpstFRET-Actina (cpA), se eliminó la molécula de actina del extremo C-terminal de cpstFRET y se utilizó en los experimentos como

control positivo, obteniendo con ella la máxima producción de FRET. El segundo plásmido, cerulean-Actina, se generó eliminando el fluorocromo YFP/Venus, y se usó como control negativo, obteniendo la mínima producción de FRET.

Se cultivaron células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2 o R735X, en placas μ -slide de 8 pocillos (80821, Ibidi) a una cantidad de 10^4 células por pocillo y se transfectaron con las construcciones AcpA, cpA, pCerulean-Actina o pVenus-Actina. Tras 16 horas y antes de tomar las imágenes, se cambió el medio, por medio libre de rojo-fenol (Leibovitz's L-15 Medium, no phenol red, 21083027).

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica SP5 TCS con un objetivo 63x (HCX PL APO lambda blue 63.0x1.20 WATER UV) y una amplificación de 2. El microscopio estaba equipado con una cámara incubadora que proporcionaba condiciones controladas de temperatura (37°C), concentración de CO₂ y humedad. Las imágenes de la emisión del donante (CFP/Cerulean) y de la emisión del aceptor (YFP/Venus), se tomaron a intervalos de 2 segundos durante 60 segundos. Todas las imágenes FRET se adquirieron usando una excitación de 433 nm y una doble emisión de 475-495 nm para el CFP/Cerulean y de 530-570 nm para el YFP/Venus. Las imágenes FRET fueron procesadas con el programa Image J y se calculó el ratio FRET (R) usando la ecuación: $R = I_a/I_d$, donde I_a es la intensidad de emisión del aceptor (YFP/Venus) e I_d es la intensidad de emisión del donante (CFP/Cerulean). Por último, se calculó el ratio FRET invertido (${}_{inv}R = 1/R$) que se correlaciona de forma positiva con la tensión y la fuerza mecánica.

10. Extracción de proteína total

10.1. Células HEK293T

Para la extracción de proteínas, las células se lisaron usando una solución de NP-40 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% NP-40 e inhibidores de proteasas y fosfatasas). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4°C en agitación y después se centrifugaron a 20.000g durante 30 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes que contenían las proteínas y se cuantificaron por colorimetría utilizando el kit comercial *DC™ Protein Assay* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.2. Células HL-1

Las células se lisaron usando una solución de lisis que contenía 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% NP-40, 0,5% Tritón X-100, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,5% SDS e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras se incubaron durante 4 horas a 4°C en agitación y posteriormente se centrifugaron a 20.000g durante 30 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes que contenían los extractos proteicos y se cuantificaron por colorimetría utilizando el kit comercial *DC™ Protein Assay* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.3. Cuantificación en inmunodetección en soportes de membrana (Western Blot)

Las muestras de proteínas obtenidas se mezclaron con solución de carga (60 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente, se cargaron en geles SDS-PAGE del 8% y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Membrana Immobilon-P, 0,45 μm, Merck, IPVH00010) mediante transferencia húmeda. Con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios o secundarios a las membranas, éstas se bloquearon con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) en solución Tris salino con 0,001% de tween-20 (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos de las proteínas de interés (Tabla 6). Tras lavar la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado, se realizó la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP-conjugados) (Tabla 6) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación, se realizaron tres lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno y las membranas se revelaron usando el sistema de imagen Odyssey (Li-Cor). Las densidades de las bandas de proteínas se midieron usando el programa Image J.

| Anticuerpo | Origen | Dilución | Referencia |
|------------------------------|--------|----------|------------------------------------|
| Anti-GFP | Ratón | 1:1000 | 632380, Clontech |
| Anti-PKP2 | Ratón | 1:1000 | 651101, Progen |
| Anti-PKP2 | Cabra | 1:1000 | EB10841, Everest Biotech |
| Anti-GAPDH | Ratón | 1:1000 | sc-47724, Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-N-Cadherina | Ratón | 1:1000 | sc-59987, Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-βActina | Ratón | 1:1000 | A2228, Sigma Aldrich |
| Anti-MYH9 | Conejo | 1:500 | GTX633960, GeneTex |
| Anti-MYH10 | Ratón | 1:500 | 3404S, Cell Signaling Technology |
| Anti-ratón IgG (DyLight 680) | Oveja | 1:10000 | ABIN6699027, Antibodies-Online |

| | | | |
|-----------------------------------|-------|---------|--------------------------------|
| Anti-conejo IgG (DyLight 680) | Oveja | 1:10000 | ABIN5563398, Antibodies online |
| Anti-cabra IgG (H+L) (IRDye800CW) | Burro | 1:10000 | ABIN2169607 |

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para inmunodetección (WB).

11. Análisis del Ratio F-actina: G-actina

Las células HL-1 se cultivaron en placas p100 (100 mm) y se mantuvieron en cultivo hasta que la confluencia fue 100%. Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron raspando la placa con 1 ml de la solución de lisis y estabilización de la F-actina (solución LAS, Tabla 7).

Para cardiomiocitos aislados, se resuspendió el pellet de cardiomiocitos obtenidos de un corazón completo en 1 ml de solución LAS y se lisó y disgregó usando agujas de 25G.

Los extractos se centrifugaron a 4°C durante 90 minutos a 16.000 g. Se recuperó tanto el sobrenadante, que contenía la G-actina, como el pellet, que incluía la F-actina. Ambas fracciones se solubilizaron en 1 ml de solución de despóimerización de la actina (solución FAD, Tabla 7).

Se analizaron 15 µl, tanto de la fracción soluble (G-actina) como de la fracción del pellet (F-actina), mediante western blot siguiendo el protocolo descrito previamente.

| Solución | Composición |
|----------|--|
| LAS | 100 mM PIPES, pH 6,9, 30% glicerol, 5% DMSO, 1 mM MgSO ₄ , 1 mM EGTA, 1% TritónX-100, 1 mM ATP e inhibidores de proteasas |
| FAD | 100 mM PIPES, pH 6,9, 1 mM MgSO ₄ , 10 mM CaCl ₂ , and 5 µM citocalasina D |

Tabla 7. Lista de las soluciones empleados en la extracción de las fracciones F y G de la actina.

12. Extracción de proteínas de la membrana plasmática

Se transfectaron 5 placas p150 (150 mm) de células HEK293T por cada grupo de vectores: *pCAG-∅ + pCAG-PKP2*; *pCAG-∅ + pCAG-R735X*; o *pCAG-PKP2+ pCAG-R735X*. Tras 48 horas, las células se lavaron con PBS frío y se levantaron raspando las placas. Las proteínas de membrana se extrajeron usando el kit comercial *Plasma Membrane Protein Extraction kit* (Abcam, ab65400), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las fracciones obtenidas (proteínas citosólicas y proteínas de membrana plasmática) se cuantificaron utilizando el kit comercial *DC™ Protein Assay* (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 30 µg de proteína de cada fracción y se analizaron por western blot.

13. Co-Imunoprecipitación (Co-IP)

Las células HEK293T se transfectaron con los plásmidos *pEGFP-N1*, *pEGFP-PKP2*, o *pEGFP-R735X*. Tras 48 horas, las células se lavaron con PBS frío y se levantaron raspando las placas. Las células se lisaron siguiendo el método previamente descrito para la extracción de proteína total.

Para cada muestra se usaron 50 µl de partículas magnéticas (Dynabeads® A, 10008D, ThermoFisher Scientific), se lavaron cuatro veces con solución NP-40 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% NP-40 e inhibidores de proteasas y fosfatasas), y se incubaron con el anticuerpo de rata IgG anti-EGFP (proporcionado por la unidad de anticuerpo monoclonales del CNIO, España) a una dilución 1:100 durante 45 minutos a 4°C en agitación. El anticuerpo se retiró y se agregó 1 mg del extracto de proteína total a las partículas magnéticas, que posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación. La proteína no unida se retiró lavando las partículas magnéticas cuatro veces con solución NP-40. Las proteínas unidas se eluyeron con 30 µl de solución de carga y se desnaturalizaron a 95°C durante 15 minutos. Las muestras obtenidas de la Co-IP junto con 20 µg del extracto de proteína total de cada muestra, que se usaron como control “*input*”, se analizaron mediante western blot.

Los complejos de proteínas eluidos de la Co-IP también se emplearon para analizar los péptidos presentes por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Todo el proceso se llevó a cabo en la unidad de Proteómica del CNIC.

14. Aislamiento y purificación de ARN y qPCR

Se aisló el ARN de células HL-1 usando el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (74104, Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN de todas las muestras se cuantificó y se realizó la retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total con el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (4368814, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en sistemas de Detección de Secuencia (SDS) 7900 y 7900 fast de Applied Biosystems. Para los genes estudiados se diseñaron oligonucleótidos específicos que fueron sintetizados por Sigma Aldrich (Tabla 8). Para la reacción de la qPCR se utilizó el SYBR Green Dye (SYBR green aster mix 2X, Applied Biosystem). La abundancia relativa entre muestras se determinó usando el método de $\Delta\Delta C_t$. Para la normalización de los niveles de expresión del gen de interés, se utilizó la expresión del gen *36B4*. Los detalles de los oligonucleótidos empleados, se encuentran recogidos en la Tabla 8.

| Oligonucleótidos | Secuencias |
|------------------|----------------------|
| 36B4 F | GCGACCTGGAAGTCCAATA |
| 36B4 R | ATCTGCTGCATCTGCTTGG |
| hPKP2 F | CTGGCATCAGAGCTCCTTCC |
| hPKP2 R | TGGAATCCACGGCGACTG |

Tabla 8. Lista de oligonucleótidos utilizados para realizar las qPCR en células HL-1. F: “Forward”. R: “Reverse”.

15. Modelo tridimensional de las proteínas PKP2, R735X y R735X-EGFP

Las secuencias FASTA de PKP2 humana (UniProtKB ID: Q99959-2) y la forma mutante R735X, se modelaron empleando el paquete de programas informáticos I-TASSER v5.1. En cada caso, se seleccionó el mejor modelo, con mínima energía y plegamiento correcto (mejor alineamiento estructural respecto a la plantilla RCSB PDB ID: 3tt9, correspondiente a la estructura de las repeticiones ARM de la proteína PKP2). Posteriormente, se ejecutó un ciclo de refinamiento utilizando la herramienta “Relax” del programa Rosetta v3.8. Se seleccionaron los modelos con la topología correcta y la puntuación mínima. La estructura tridimensional de la proteína R735X-EGFP, se modeló en dos pasos. Primero, se modeló la estructura de la proteína EGFP, a partir de su secuencia FASTA (UniProtKB ID: C5MKY7), empleando el paquete de programas informáticos I-TASSER v5.1. Se seleccionó el mejor modelo, con mínima energía y plegamiento correcto (mejor alineamiento estructural con las plantillas publicadas). La proteína de fusión R735X-EGFP, se modeló utilizando la herramienta “RosettaCM” del programa Rosetta v3.8, comparándolo y alineándolo con el modelo de la proteína R735X. Se seleccionó aquel modelo con la mejor alineación estructural respecto a la plantilla del modelo R735X y la mínima energía. Posteriormente, se ejecutó un ciclo de refinamiento utilizando la herramienta “Relax” del

programa Rosetta v3.8 y se seleccionó el modelo con la topología correcta y la puntuación mínima. Todo el proceso se llevó a cabo en la unidad de Bioinformática del CNIC.

16. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 8. Todos los datos están representados como la media \pm s.d (desviación estándar) o como la mediana \pm los valores mínimos a máximos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un p-valor $< 0,05$. En cada figura el p-valor se representó como sigue: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ y ns $> 0,05$. Los test estadísticos usados para calcular el p-valor de cada experimento, se encuentran especificados en cada pie de figura. El test *t*-Student se usó para comparar la media de dos grupos. La ANOVA de una o dos vías seguida de un post-test de comparaciones múltiple de Dunnet, se empleó para comparar la media de varios grupos con respecto a la media de un grupo control. La ANOVA de dos vías seguida de un post-test de comparaciones múltiple de Tukey o de Sidak, se utilizó para comparar la media de múltiples grupos entre sí.

Resultados

1. Caracterización del mutante patogénico de PKP2 R735X

1.1. La proteína mutante R735X se acumula menos eficientemente que la proteína PKP2 “wild-type”

La mayoría de las mutaciones en *PKP2* descritas en pacientes con cardiomiopatía arritmogénica (ACM, del inglés “Arrhythmogenic Cardiomyopathy”), generan proteínas truncadas, en ocasiones inestables, lo que induce su degradación (Kirchner Florian et al., 2012). Usando un modelo *in vitro* de células HL-1, se estudió el efecto de la carencia de la región C-terminal en la proteína PKP2. Así, se generaron líneas celulares que expresaban de forma estable el gen humano *PKP2* “wild-type” o con la mutación que codifica para la proteína R735X. El análisis por western blot (Fig. 9A) muestra que los niveles de proteína mutante R735X son menores que los de la proteína PKP2 “wild-type” (Fig. 9B). Esta diferencia podría deberse a una regulación diferencial del ARNm o a diferencias en la estabilidad de la proteína. En células HL-1 que expresan de forma estable PKP2 “wild-type” o R735X, el análisis del ARNm demuestra que no hay diferencias significativas entre los niveles de expresión de *PKP2* “wild-type” y el mutante R735X (Fig. 9C). Estos datos sugieren que la disminución de la cantidad de proteína mutante R735X debe estar mediada por diferencias en la estabilidad de la proteína que carece de la región C-terminal.

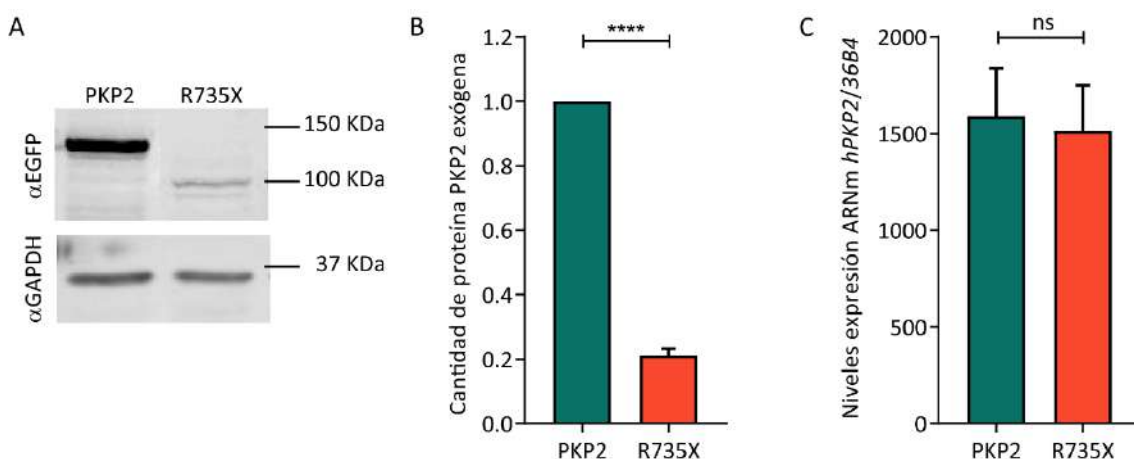


Figura 9. Los niveles totales de la proteína mutante R735X disminuyen en células HL-1. A. Western blot de células HL-1 que expresan de forma estable EGFP-PKP2 o EGFP-R735X, utilizando anticuerpos frente a EGFP y GAPDH. **B.** Cuantificación de la cantidad de proteína de PKP2 y R735X, relativa a la cantidad de

PKP2 “*wild-type*”. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar; **** $p < 0,0001$ por prueba *t*-Student, $n=4$ para cada grupo. **C.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de la variante humana de PKP2 (*hPKP2*), “*wild-type*” o mutante R735X a partir de ARN total. El gen *36B4* se utiliza como control para calcular la expresión relativa de PKP2. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar; n_s $p > 0,05$ por prueba *t*-Student, $n=3$ para cada grupo.

1.2. La proteína mutante R735X está deslocalizada

PKP2 es una proteína desmosomal con una localización subcelular muy determinada, donde ejerce su función. Para determinar si la delección de la región C-terminal de PKP2 induce cambios en la distribución espacial de la proteína, se analizaron líneas celulares de HL-1 que expresaban de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o EGFP (como control negativo). En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se observó que la proteína EGFP-PKP2 se localiza principalmente en el borde de las células, distribuyéndose de forma similar a como lo hace la proteína endógena (Fig. 10A, panel izquierdo). Por el contrario, la mayoría de la proteína EGFP-R735X, se encuentra distribuida en el citoplasma, apareciendo de forma ocasional en el borde de la célula (Fig. 10A, panel central). La figura 10B muestra el análisis de las imágenes de microscopía confocal, en las que se cuantificó la intensidad de señal de EGFP-PKP2 y EGFP-R735X que aparecía en la membrana plasmática (amarillo) y en el citoplasma (morado). La cuantificación muestra que la proteína mutante se encuentra localizada de forma significativa preferentemente en el citoplasma, al contrario que lo que ocurre con la proteína PKP2, que se encuentra mayoritariamente asociada a la membrana (Fig. 10C).

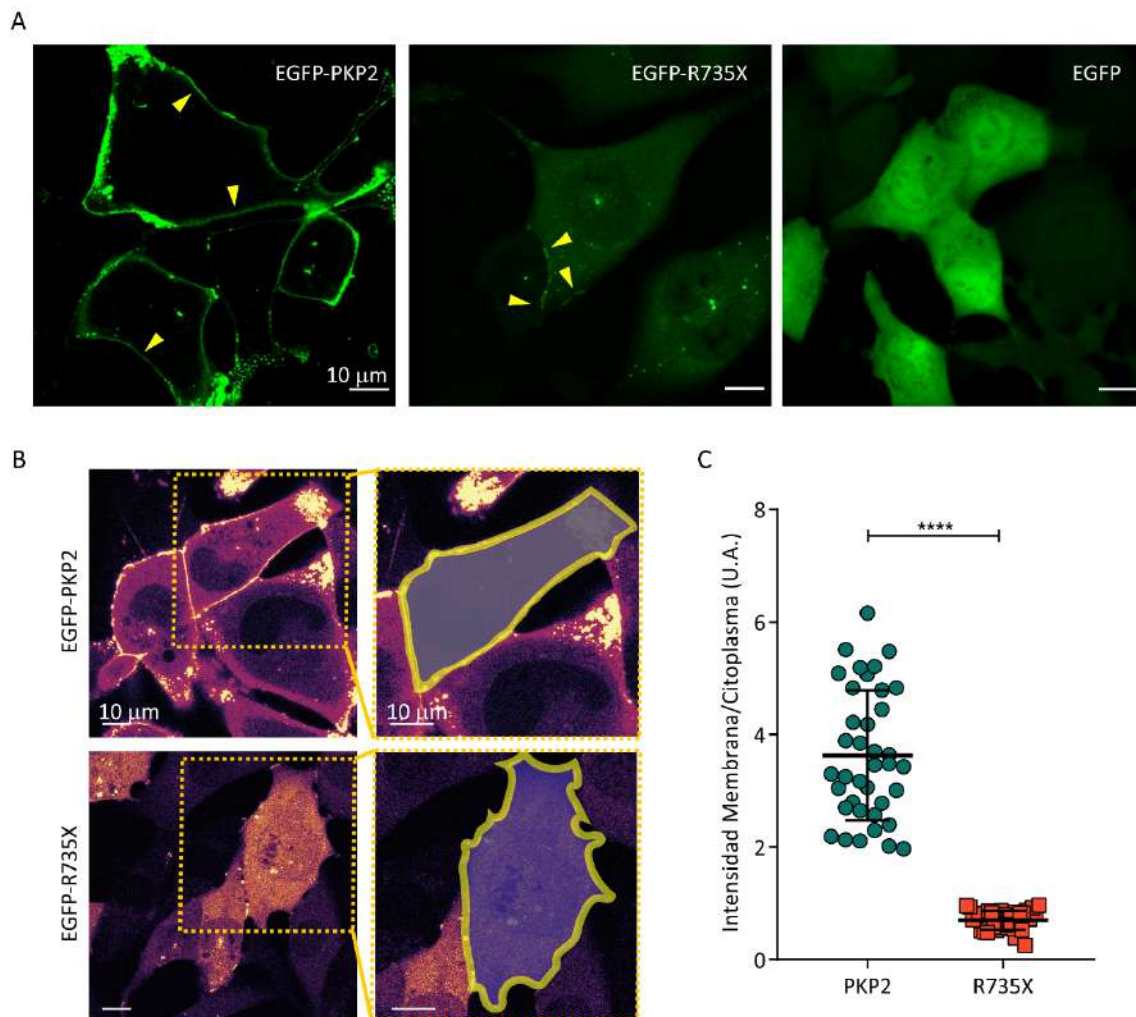


Figura 10. La proteína mutante R735X se localiza mayoritariamente en el citoplasma. A. Imágenes representativas de microscopía confocal de células HL-1 que expresan de forma estable EGFP-PKP2 (panel izquierdo), EGFP-R735X (panel central) o EGFP (panel derecho). Las flechas amarillas indican la localización de EGFP-PKP2 o EGFP-R735X, respectivamente, en el borde de la célula. Barra de escala= 10 μm. **B.** Imágenes representativas de células HL-1 que expresan EGFP-PKP2 (paneles superiores) o EGFP-R735X (paneles inferiores) procesadas para analizar la intensidad de la señal de PKP2 o R735X en la membrana (amarillo) y en el citoplasma (morado). Barra de escala= 10 μm. **C.** Cuantificación de los niveles de intensidad de la señal de PKP2 o R735X en la membrana plasmática respecto a los niveles en el citoplasma. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar; **** $p < 0,0001$ por prueba *t*-Student. EGFP-PKP2 $n=38$ y EGFP-R735X $n=39$.

Para estudiar la localización de estas proteínas en un sistema cardiaco complejo, se generaron animales que expresaban las proteínas de fusión EGFP-PKP2, EGFP-R735X o EGFP en el corazón, usando virus adeno-asociados (AAV). Las inmunohistoquímicas muestran que la proteína EGFP-PKP2 se localiza mayoritariamente en las uniones entre los cardiomiocitos donde se localizan los

desmosomas (Fig. 11A). Sin embargo, la proteína mutante EGFP-R735X, se localiza preferentemente en el citoplasma de los cardiomiocitos (Fig. 11B).

Estos datos demuestran que el comportamiento de las proteínas EGFP-PKP2 y EGFP-R735X es similar en un sistema *in vitro* (células HL-1) e *in vivo* (cardiomiocitos de ratón). Además, indican que la proteína R735X no está localizada en la cara interna de la membrana plasmática como ocurre con la proteína PKP2 “*wild-type*”, si no que se distribuye por el espacio intracelular, lo que puede afectar a su función.

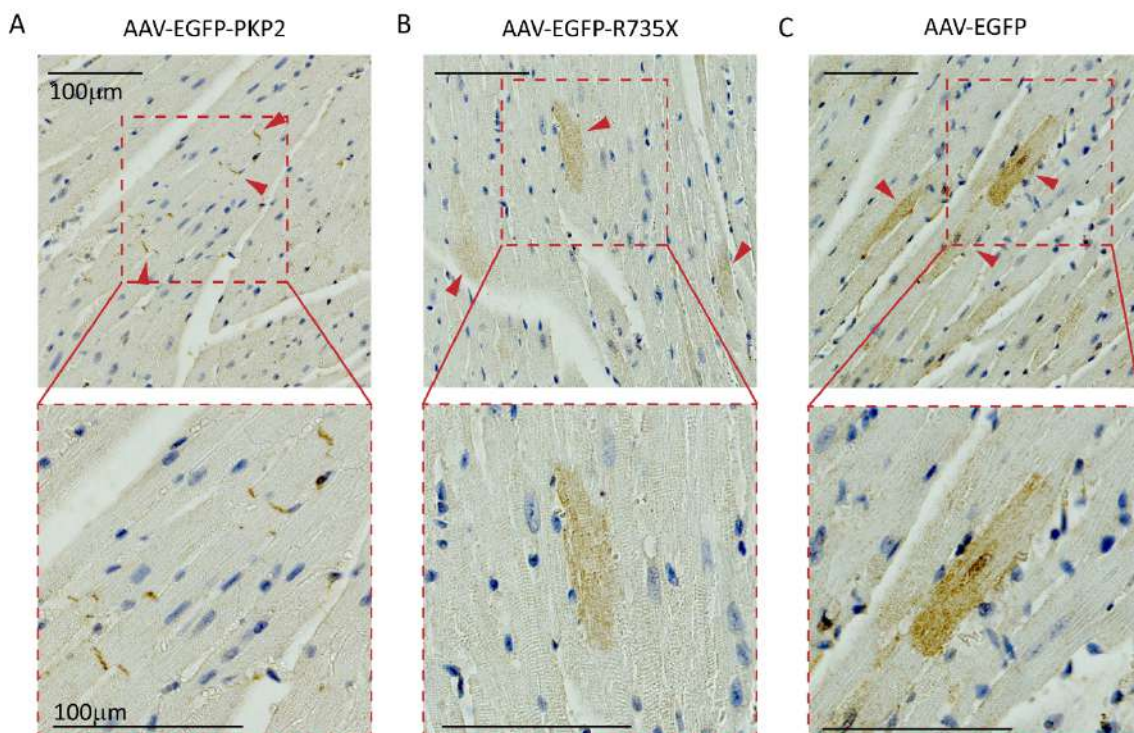


Figura 11. La proteína mutante R735X se encuentra deslocalizada en los cardiomiocitos *in vivo*. Imágenes representativas de cortes de tejido cardiaco de ratones inyectados con AAV-EGFP-PKP2 (A), AAV-EGFP-R735X (B) o AAV-EGFP (C). Las flechas rojas indican la tinción por inmunohistoquímica de EGFP, mostrando la localización de cada proteína en los cardiomiocitos infectados. Las imágenes de los paneles inferiores muestran la amplificación de un área específica. Barra de escala= 100 μm.

1.3. El mutante R735X no afecta a la función de PKP2

En general, las mutaciones en PKP2 en pacientes con ACM se presentan en heterocigosis, ya que en homocigosis es letal (Grossmann et al., 2004). Debido a esto, se analizó si la presencia del mutante R735X alteraba los niveles y la localización subcelular de PKP2. En primer lugar, se

utilizaron células HL-1 control y células que expresaban de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o un ARN de horquilla corta que silenciaba la expresión de *PKP2* (*shPKP2*). Se compararon los niveles de proteína PKP2 endógena usando un anticuerpo específico contra la región C-terminal (Fig. 12A). El análisis por western blot muestra que en presencia de la proteína mutante R735X, los niveles endógenos de PKP2 se mantienen. Sin embargo, las células en las que se silencia la expresión de *PKP2* mediante el *shPKP2*, los niveles totales de PKP2 endógeno disminuyen de forma significativa (Fig. 12B). Estos datos sugieren que la proteína mutante R735X no genera haploinsuficiencia, como ocurre cuando se expresa el *shPKP2*.

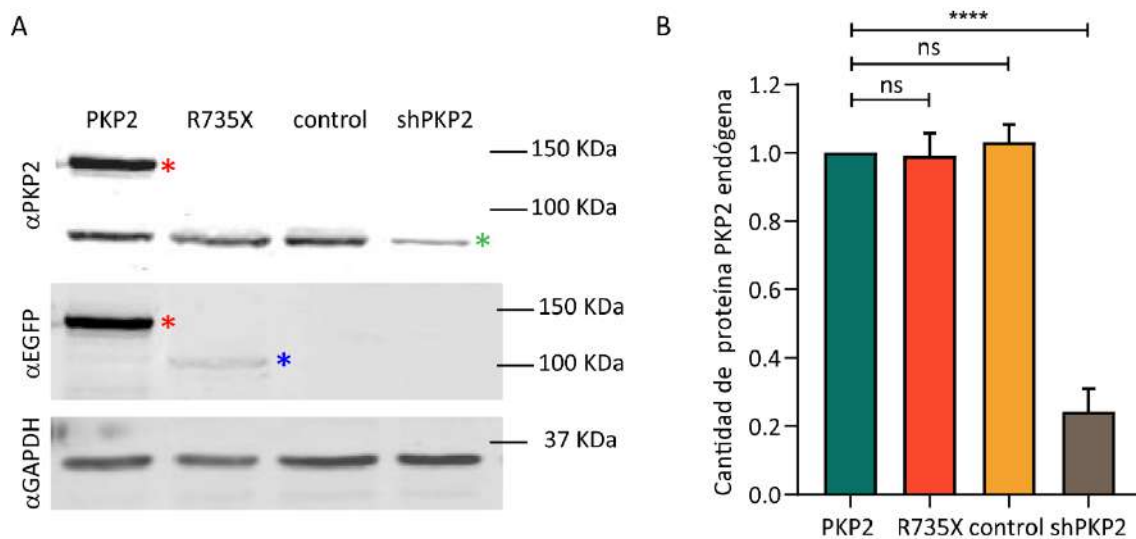


Figura 12. El mutante R735X no altera los niveles de PKP2 endógeno. **A.** Western blot de células HL-1 control o que expresan de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o *shPKP2*, utilizando anticuerpos frente a PKP2 (específico contra la región C-terminal), EGFP y GAPDH. EGFP-PKP2≈ 128 KDa (asterisco rojo); EGFP-R735X≈ 100KDa (asterisco azul); PKP2 endógeno≈ 97 KDa (asterisco verde). **B.** Cuantificación de los niveles totales de la proteína PKP2 endógena, relativa a la cantidad de PKP2 “wild-type”. Los datos se presentan como media ± desviación estándar; ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n=4$ para cada grupo.

Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos *pCAG-PKP2*, *pCAG-R735X* o con ambos simultáneamente, para estudiar la localización subcelular de las proteínas PKP2 y R735X y descartar cualquier efecto que pueda producir la fusión a EGFP en la localización de estas proteínas. El subfraccionamiento celular confirmó los datos previos de localización (Fig. 10A) y muestra que PKP2 “wild-type” se localiza preferentemente en la fracción de membrana plasmática y el mutante R735X, en la fracción citoplasmática y solo minoritariamente, en la fracción de membrana plasmática (Fig. 13). Destacar que la localización subcelular de PKP2 “wild-type” no se modifica en presencia de la proteína mutante R735X. Por el contrario, los

niveles de la proteína R735X asociados a la fracción de membrana plasmática aumentan cuando se cotransfectan ambos genes (Fig. 13). Estos resultados demuestran que la presencia de la proteína mutante R735X no afecta ni a los niveles totales, ni a la localización de la proteína PKP2 “wild-type”, lo que sugiere que el mutante R735X no interfiere en la función de PKP2.

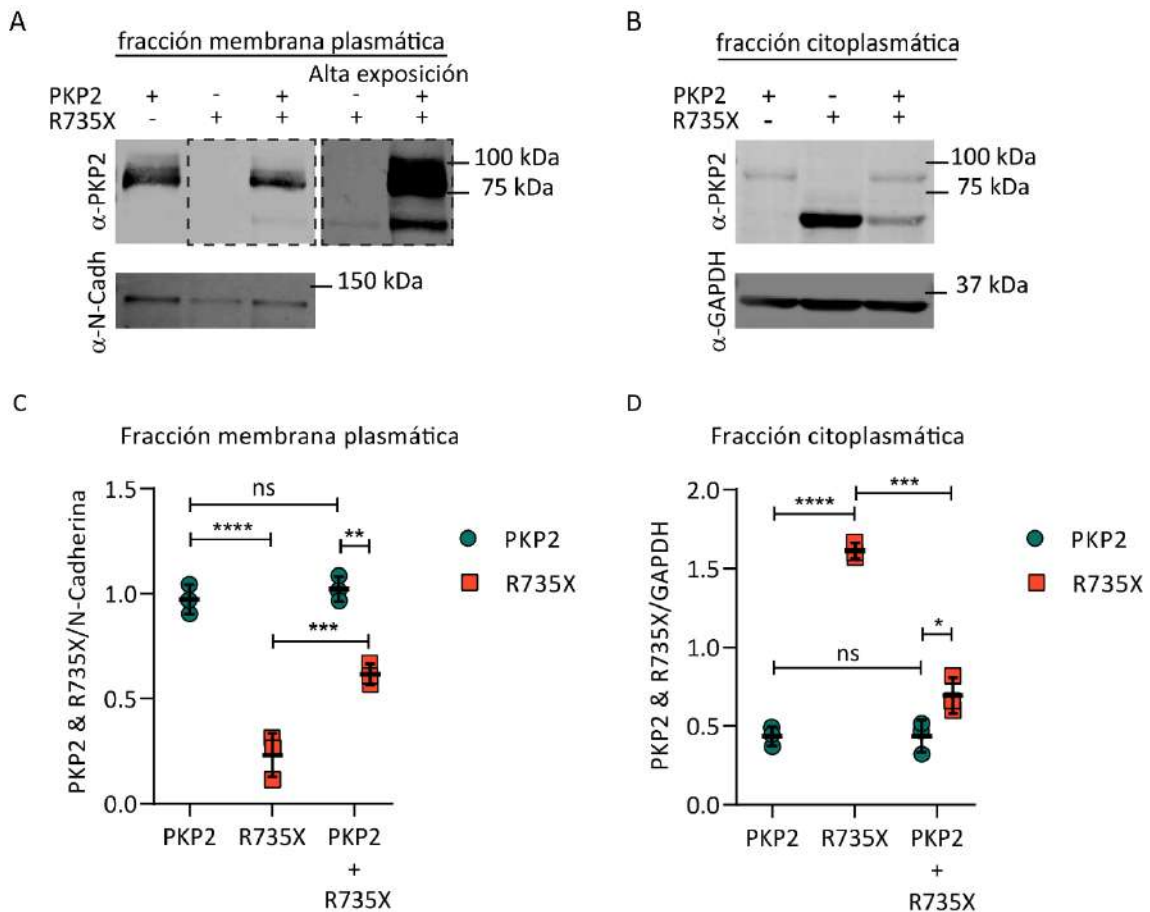


Figura 13. El mutante R735X no altera la localización subcelular de la proteína PKP2. **A.** Western blot de las proteínas PKP2 y R735X presentes en la fracción de membrana plasmática. Se utilizaron anticuerpos frente a PKP2 y N-Cadherina (control de carga de la fracción de membrana). Las líneas discontinuas negras delimitaban una baja y una alta exposición de la membrana. **B.** Western blot de las proteínas PKP2 y R735X presentes en la fracción citoplasmática. Se utilizaron anticuerpos frente a PKP2 y GAPDH (control de carga de la fracción citoplasmática). **C** y **D.** Cuantificación de PKP2 y R735X en la fracción de membrana plasmática y en la fracción citoplasmática, respectivamente. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, $n=3$ para cada grupo.

1.4. La región C-terminal de PKP2 estabiliza la estructura de la proteína

Los resultados previos indican que la ausencia de la región C-terminal, modifica la localización y la estabilidad de la proteína mutante R735X. Para determinar si la alteración de estas propiedades de la proteína mutante R735X se correlacionaba con un cambio en su estructura, se realizó un modelo tridimensional de la estructura de la proteína PKP2 “wild-type” (Fig. 14A) y la proteína mutante R735X (Fig. 14B). El análisis del modelo tridimensional reveló que la región C-terminal (región morada) es determinante para la estabilidad general de la proteína, y su ausencia en la proteína mutante R735X, impide un correcto plegamiento del dominio N-terminal sobre el dominio armadillo (región amarilla), que incrementa la inestabilidad de toda la estructura. El análisis de la estructura del mutante R735X evidencia marcadas diferencias topológicas en la orientación y en la estabilidad del dominio N-terminal (región azul). Este cambio conformacional también provoca una modificación de la distribución de cargas globales en la superficie de la proteína mutante R735X con respecto a PKP2. Estos datos sugieren que la carencia de la región C-terminal en la proteína mutante R735X, altera su conformación y modifica propiedades como la función, localización e interacción con otras proteínas.

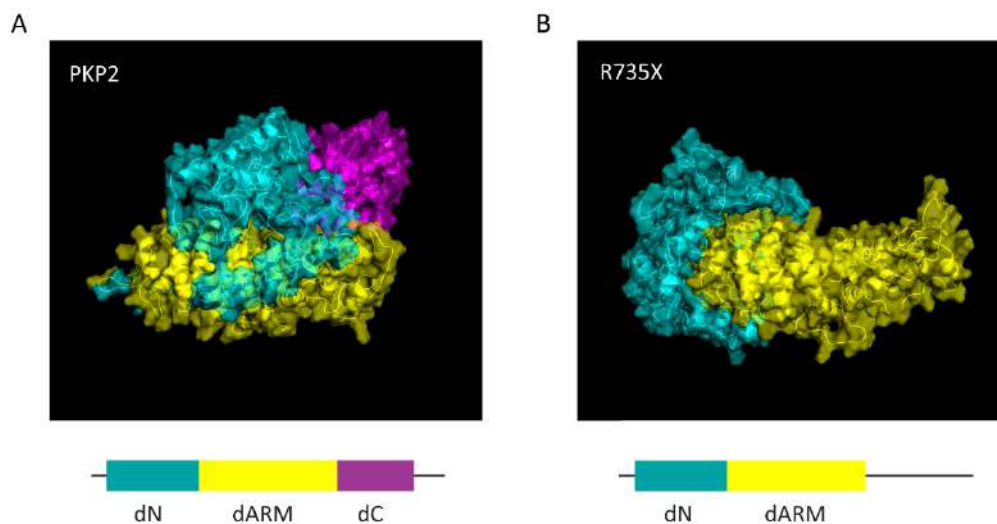


Figura 14. Modelo tridimensional de la proteína PKP2 y la proteína mutante R735X. Modelo tridimensional que muestra la estructura y la organización de los dominios de las proteínas PKP2 “wild-type” (A) y mutante R735X (B). Dominio N-terminal, dN (azul); dominio interno armadillo, dARM (amarillo); dominio C-terminal, dC (morado).

2. Caracterización del fenotipo estructural relacionado con la cardiomiopatía arritmogénica provocado por la mutación R735X

2.1. El mutante R735X altera la contracción y la función ventricular

En pacientes con ACM los estudios de imagen por resonancia magnética (MRI) son esenciales para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (Towbin et al., 2019). Para evaluar un posible fenotipo estructural relacionado con la presencia de la mutación R735X, se realizó un estudio por MRI en ratones control o inyectados con AAV que codificaban para PKP2, R735X o *shPKP2*. El análisis de las imágenes obtenidas por MRI, muestra que no hay diferencias significativas en el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDF-VI) (Fig. 15A) ni en el volumen diastólico final del ventrículo derecho (VDF-VD) (Fig. 15B) entre los cuatro grupos. El volumen sistólico final del ventrículo izquierdo (VSF-VI) muestra un aumento no significativo en los animales inyectados con AAV-*R735X* (Fig. 15A). En contraste, el volumen sistólico final del ventrículo derecho (VSF-VD) es significativamente mayor en los ratones inyectados con AAV-*R735X* (Fig. 15B). En los ratones control o inyectados con AAV-*shPKP2* no se observan diferencias significativas. En la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FE-VI) se observa una disminución estadísticamente no significativa en los ratones inyectados con AAV-*R735X* y en el resto de los grupos no hay diferencias (Fig. 15C). Sin embargo, la fracción de eyección del ventrículo derecho (FE-VD) es significativamente menor en los ratones inyectados con AAV-*R735X* con respecto a los inyectados con AAV-*PKP2* (Fig. 15C). En el caso de los ratones control e inyectados con AAV-*shPKP2*, no se observan diferencias (Fig. 15C). Las MRI obtenidas de ratones inyectados con AAV-*R735X*, muestran una dilatación de ambos ventrículos, pero sobre todo, del ventrículo derecho (Fig. 15D), en consonancia con las mediciones obtenidas. Estos resultados indican que la mutación R735X afecta a la capacidad de contracción de los ventrículos, principalmente al ventrículo derecho. Por el contrario, ninguno de estos efectos se manifiesta en ratones en los que se silencia la expresión de *PKP2* (AAV-*shPKP2*), sugiriendo que es la presencia de la proteína mutante R735X y no la disminución de la cantidad de proteína de *PKP2*, la que provoca esta disfunción en la contracción y en la función cardíaca.

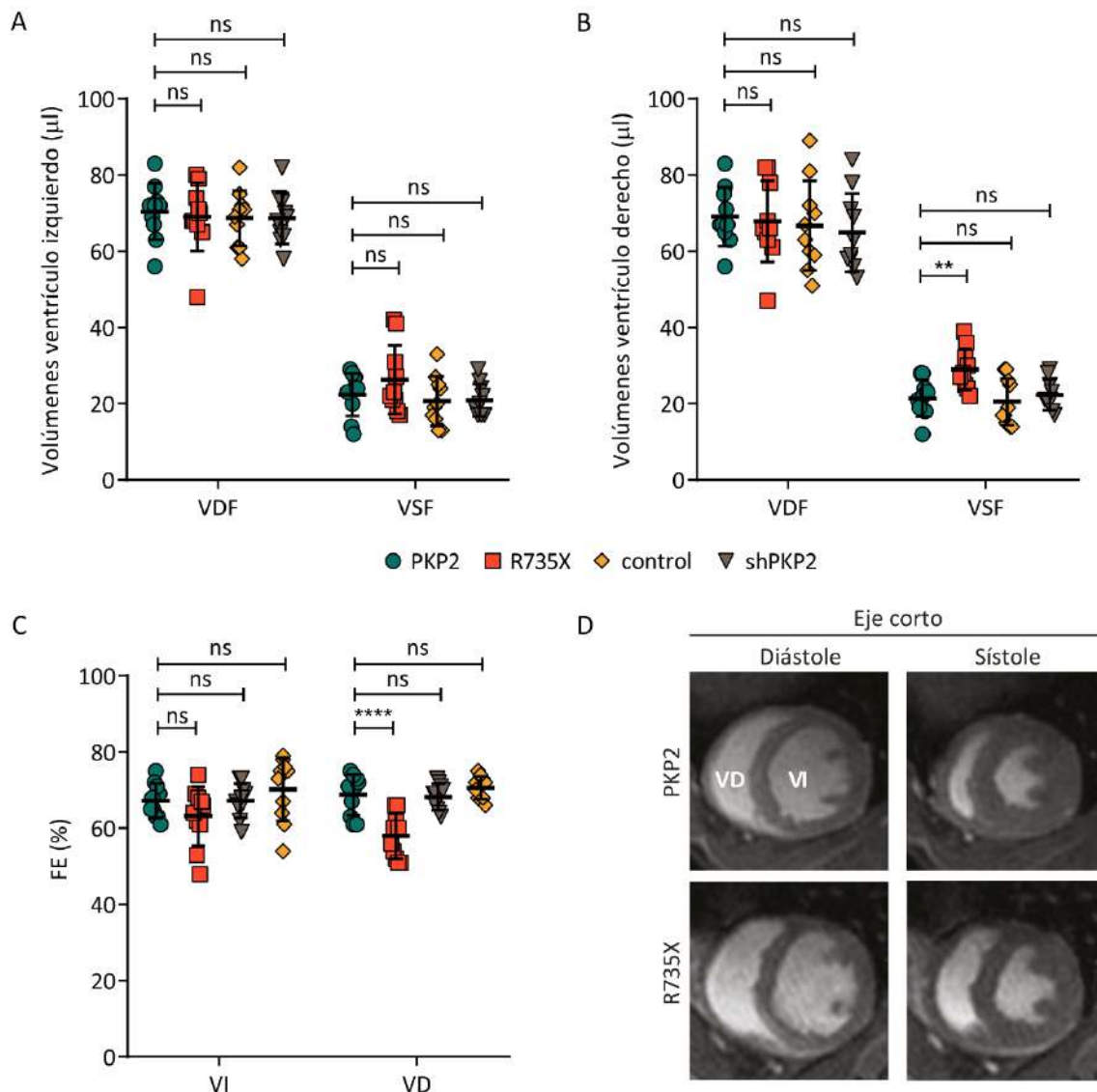


Figura 15. La expresión del mutante R735X en un modelo *in vivo* produce una disfunción cardíaca. Cuantificación del VDF y del VSF en el ventrículo izquierdo (**A**) y en el ventrículo derecho (**B**) mediante MRI de corazones de ratones control o inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* o AAV-*shPKP2*. **C.** Análisis de la FE del ventrículo izquierdo y del ventrículo derecho mediante MRI de corazones de ratones control o inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* o AAV-*shPKP2*. Los datos en A, B y C se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n = 10$ para todos los grupos. **D.** Imágenes representativas del eje corto, en diástole y en sístole, de ratones inyectados con AAV-*PKP2* o AAV-*R735X* donde se aprecian el ventrículo izquierdo (VI) y el ventrículo derecho (VD).

Para determinar con más detalle el nivel de contracción de los sarcómeros, se tomaron imágenes de muestras de corazón de ratones inyectados con AAV-*PKP2* o con AAV-*R735X* por microscopía electrónica de transmisión (MET) y se analizó la longitud sarcomérica (longitud Z-Z) en sarcómeros relajados (Fig. 16A, paneles superiores) y contraídos (Fig. 16A, paneles inferiores).

El análisis muestra que en sarcómeros relajados, la longitud Z-Z no presenta diferencias significativas entre los ratones inyectados con AAV-*PKP2* y los inyectados con AAV-*R735X*. Por el contrario, en sarcómeros contraídos, la longitud Z-Z es mayor en ratones inyectados con AAV-*R735X* (Fig. 16B). Por tanto, estos resultados indican que los sarcómeros de los ratones transducidos con AAV-*R735X* tienen menos capacidad de contracción, apoyando la hipótesis de que la mutación *R735X* compromete la función cardíaca.

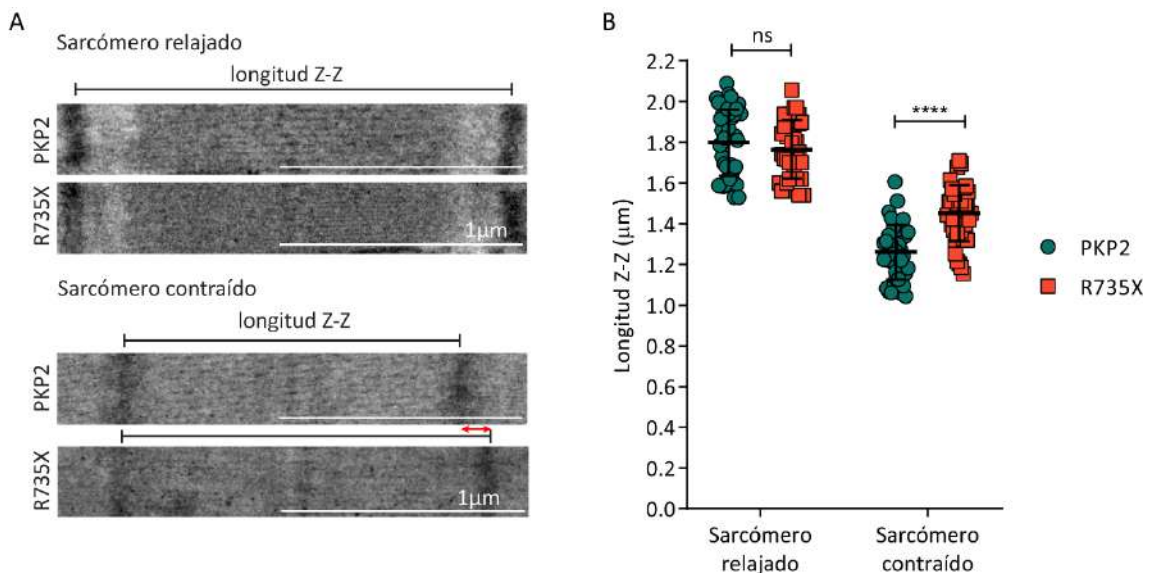


Figura 16. La expresión del mutante R735X altera la contracción del sarcómero. **A.** Imágenes representativas de TEM de sarcómeros relajados (paneles superiores) y de sarcómeros contraídos (paneles inferiores) de corazones de ratones adultos inyectados con AAV-*PKP2* o AAV-*R735X*. La longitud Z-Z que se midió se señala con una línea negra. En las imágenes de los sarcómeros contraídos, el incremento de longitud Z-Z del sarcómero de ratones *R735X* respecto al sarcómero de ratones *PKP2*, se señala con una flecha roja. Barra de escala = 1 μm. **B.** Cuantificación de la longitud Z-Z en sarcómeros relajados (parte izquierda) y contraídos (parte derecha) de corazones de ratones inyectados con AAV-*PKP2* o AAV-*R735X*. Los datos se presentan como media ± desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por prueba *t*-Student, $n = 40$ para cada grupo. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo.

2.2. PKP2 interacciona con proteínas del citoesqueleto

Las proteínas no existen de forma aislada y sus funciones no pueden entenderse sin considerar las interacciones con otras proteínas, sin embargo, la presencia de mutaciones pueden afectar a dichas interacciones (Vidal et al., 2011). Con el fin de encontrar posibles candidatos que pudieran relacionar a PKP2 con las alteraciones observadas en las MRI, se analizaron los

interactomas de PKP2 y de R735X. Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos *pCMV-EGFP-PKP2*, *pCMV-EGFP-R735X* o *pCMV-EGFP* y se realizaron co-inmunoprecipitaciones (Co-IP), que posteriormente se analizaron por espectrometría de masas (MS) (Fig. 17A). Entre las proteínas identificadas, se encontraron proteínas que ya se han descrito que interactúan con PKP2, como desmoplaquina (DSP), placoglobina (JUP), desmogleína (DSG1) y desmocolina (DSC1). Se identificaron nuevas interacciones de PKP2 como con la miosina 9 (MYH9), miosina 10 (MYH10), actina citoplasmática (ACTB) y actina sarcomérica (ACTA) (Fig. 17B). En general, el número de péptidos identificados en la muestra R735X fue superior a la de PKP2 “*wild-type*”. Sin embargo, al relativizar la cantidad de proteínas identificadas a la cantidad de proteína de PKP2, “*wild-type*” o R735X, presente en cada muestra, respectivamente, se observa que la interacción con las proteínas del desmosoma (DSP, JUP, DSG1 y DSC1) es menor en el mutante R735X (Fig. 17C). En el caso de las nuevas interacciones identificadas, la interacción con la MYH9 y ACTA es similar en el mutante R735X y PKP2 “*wild-type*”. Sin embargo, el mutante R735X presenta una mayor interacción con la MYH10 y ACTB (Fig. 17C).

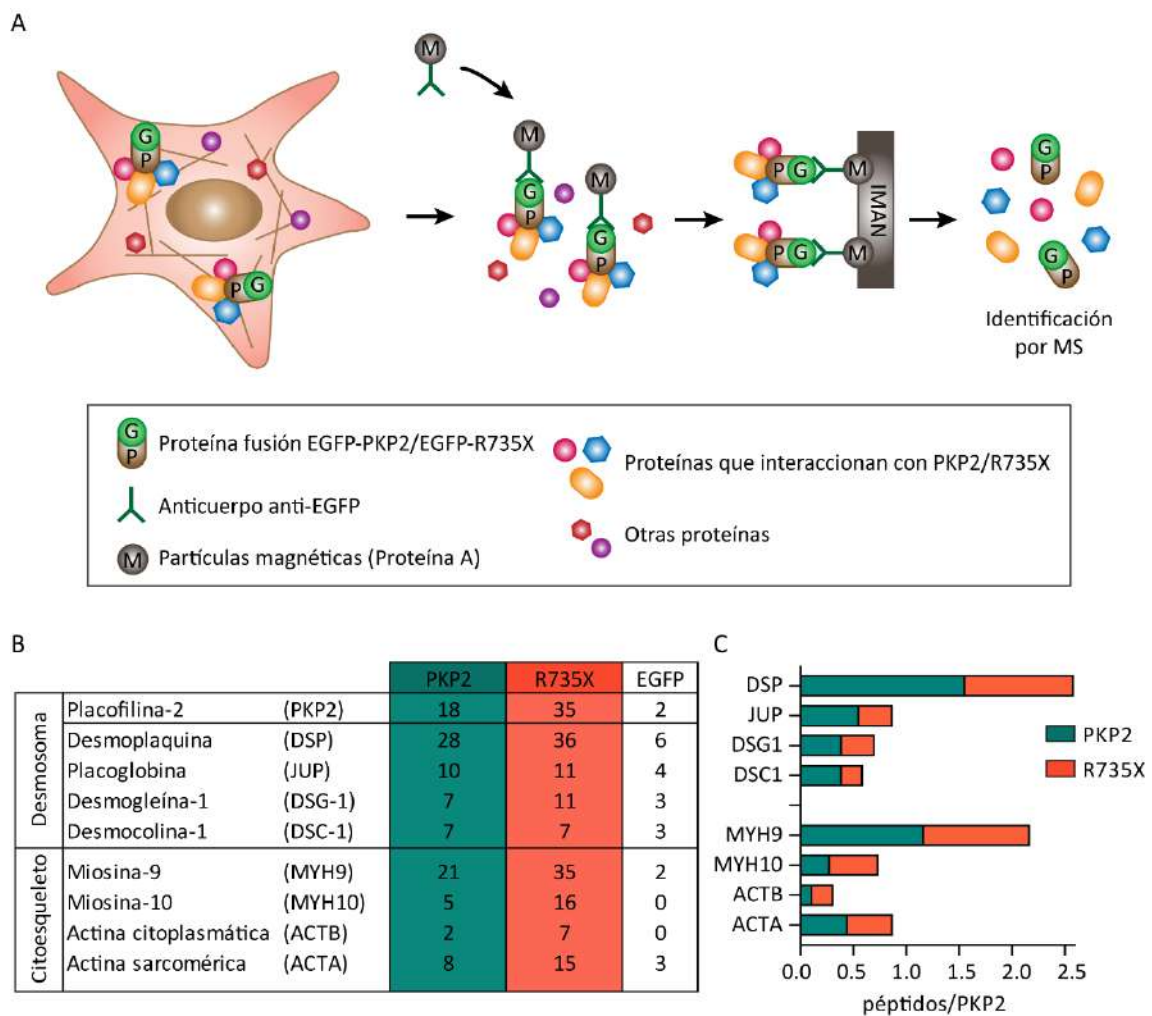


Figura 17. Identificación de proteínas que interactúan con PKP2. **A.** Diagrama que muestra el protocolo de la co-inmunoprecipitación (Co-IP) que se realizó para aislar las proteínas que interactúan con PKP2. **B.** La tabla muestra el recuento único de las proteínas identificadas más abundantes en los productos de la Co-IP de las muestras que contenían la proteína PKP2 “wild-type” (columna azul) o la proteína mutante R735X (columna naranja). La señal de EGFP se usó como control. **C.** Abundancia de las proteínas anteriormente identificadas relativa a la cantidad de PKP2, “wild-type” o R735X, presente en dichas muestras.

Para validar los resultados obtenidos por MS, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos *pCMV-EGFP-PKP2*, *pCMV-EGFP-R735X* o *pCMV-EGFP* y se realizó una Co-IP de MYH9 y de MYH10. El análisis por western blot (Fig. 18A) muestra que la MYH9 y la MYH10, interactúan con PKP2 y con el mutante R735X. La MYH9 coimmunoprecipita en cantidades similares con ambas versiones de la proteína PKP2, mientras que la MYH10 coimmunoprecipita más eficientemente con la proteína mutante R735X (Fig. 18B). En conjunto, estos resultados confirman que PKP2 interactúa con proteínas del citoesqueleto de actomiosina y que la mutación R735X altera estas interacciones.

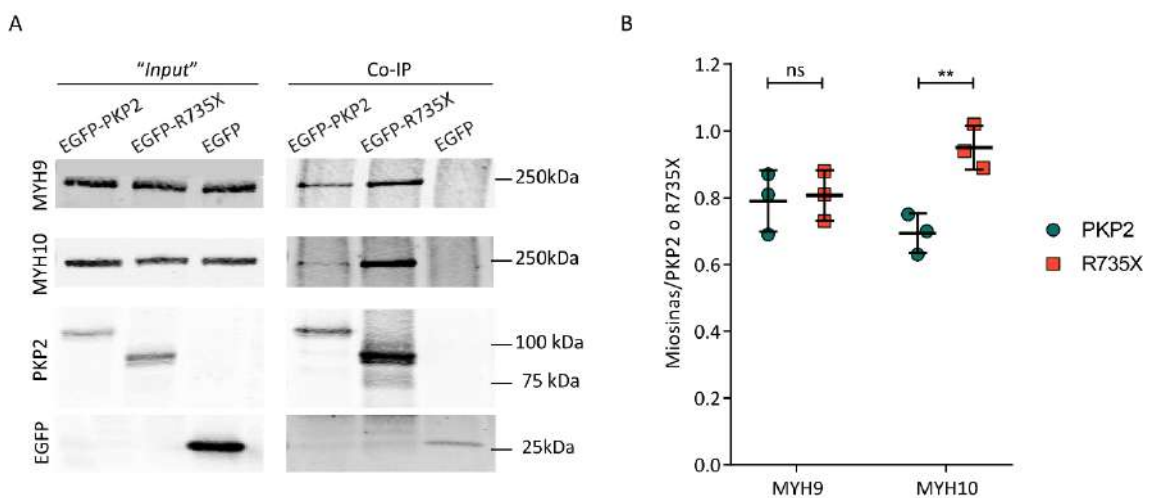


Figura 18. Las proteínas PKP2 “wild-type” y mutante R735X interactúan con MYH9 y MYH10. **A.** Western blot de la Co-IP de MYH9 y MYH10. Se muestran tanto los extractos de proteínas iniciales o “input” (paneles izquierdos), como los resultados de la Co-IP (paneles derechos). Se utilizaron anticuerpos frente a MYH9, MYH10 y EGFP. **B.** Cuantificación de la cantidad de proteína de MYH9 y MYH10, relativa a la cantidad de proteína PKP2 “wild-type” o mutante R735X. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n = 3$ para cada grupo.

2.3. El mutante R735X interfiere en la correcta localización de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la proteína mutante R735X se deslocaliza en el citoplasma e interacciona con proteínas del citoesqueleto de actomiosina. Para determinar si estas características de la proteína R735X provocaban un cambio en la organización de los componentes del citoesqueleto de actomiosina, se analizó la localización subcelular de la MYH9, MYH10 y actina a nivel del córtex celular, en células HL-1 que expresaban de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o *shPKP2* (Fig. 19A). El análisis de los perfiles de intensidad a partir de imágenes de microscopía confocal, muestra que en las células que expresan de forma estable EGFP-PKP2, el perfil de PKP2 “*wild-type*” (verde) coincide con el perfil de la actina (gris) en la zona más externa de la célula. Sin embargo, los perfiles de intensidad de la MYH9 (rojo) y MYH10 (azul) están más desplazados hacia la derecha, indicando que se localizan en una zona más interna de la célula respecto a PKP2 (Fig. 19B, panel izquierdo). Por el contrario, en las células que expresan de forma estable EGFP-R735X, los perfiles de intensidad de la actina, MYH9 y MYH10, se superponen completamente con el perfil de PKP2 (R735X) (Fig. 19B, panel central). En el caso de las células que expresan de forma estable *shPKP2*, los perfiles de intensidad de la MYH9 y MYH10 siguen el mismo patrón que en las células que expresan de forma estable EGFP-PKP2. Sin embargo, el perfil de la actina está desplazado hacia la derecha, coincidiendo con el perfil de la MYH10 (Fig. 19B, panel derecho). El análisis de las distancias relativas de las proteínas del citoesqueleto respecto a la localización de la proteína PKP2 “*wild-type*” confirma estos resultados (Fig. 19C). Estos resultados sugieren que PKP2 es importante para la localización de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina a nivel del córtex celular.

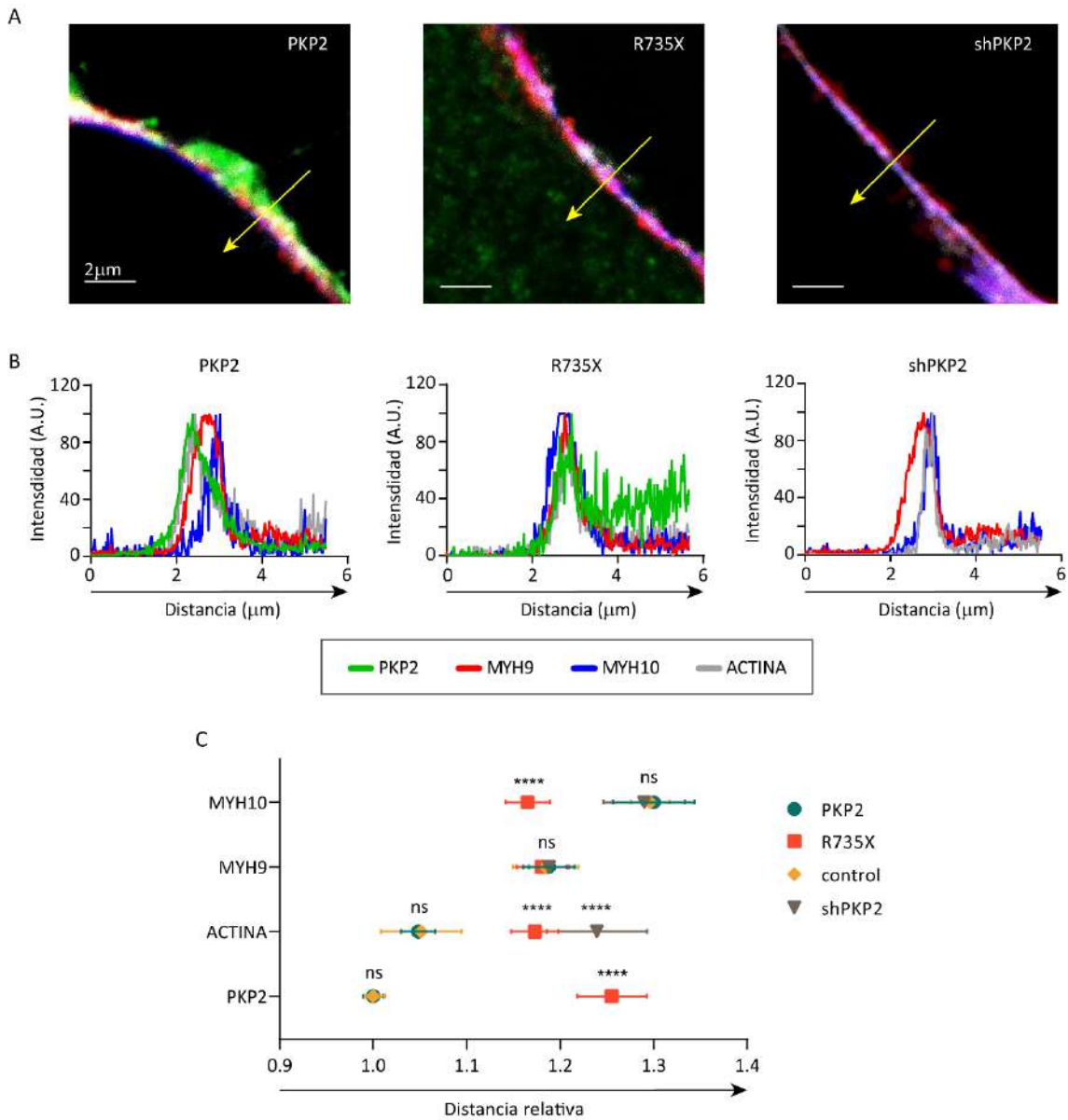


Figura 19. La expresión del mutante R735X altera la localización de la actina y la MYH10. A. Imágenes representativas de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de PKP2 o R735X (verde), MYH9 (rojo), MYH10 (azul) y actina (gris) en células HL-1 que expresan de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o *shPKP2*. Las flechas amarillas están trazadas desde el exterior de la célula hacia el citoplasma. Barra de escala= 2 μ m. **B.** Perfiles de intensidad medidos siguiendo la dirección de las flechas amarillas, para PKP2 (o R735X), MYH9, MYH10 y actina en el borde celular. **C.** Gráfica que muestra la distancia relativa entre los picos máximos de intensidad de los perfiles de PKP2, MYH9, MYH10 y actina, en células HL-1 control o que expresan de forma estable EGFP-PKP2, EGFP-R735X o *shPKP2*. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n = 5$ para cada grupo.

2.4. El mutante R735X altera la distribución de la MYH9 y MYH10

Los resultados previos muestran que la presencia de la proteína mutante R735X, modifica la correcta localización de la MYH10 a nivel del córtex celular. Debido a esto, se comprobó si la estructura del citoesqueleto que conformaban la MYH9 y la MYH10 también estaba alterada. Se tomaron imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de MYH9 y MYH10, en células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2 “*wild-type*” o el mutante R735X. La mayoría de la MYH9 aparece de forma acumulada y, solamente en las células que expresan PKP2, se organiza formando filamentos (Fig. 20A). La MYH10 se distribuye formando filamentos, tanto en las células que expresan PKP2 como en las que expresan el mutante R735X, pero aparecen mejor estructurados en las células que expresan PKP2 (Fig. 20B). Se analizaron las imágenes y se cuantificaron el número de ramificaciones presentes en la estructura que conforma cada miosina y su longitud (Fig. 20C). La cuantificación muestra que las células que expresan de forma estable PKP2, presentan mayor número de ramificaciones y de mayor longitud, tanto en la MYH9 como en la MYH10, respecto a las células que expresan de forma estable el mutante R735X (Fig. 20D y 20E). En el caso de las células HL-1 en las que se silencia la expresión de PKP2 (*shPKP2*), no hay diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros analizados (Fig. 20D y 20E). Estos resultados indican que la presencia del mutante R735X, altera la distribución del citoesqueleto que conforman la MYH9 y la MYH10.

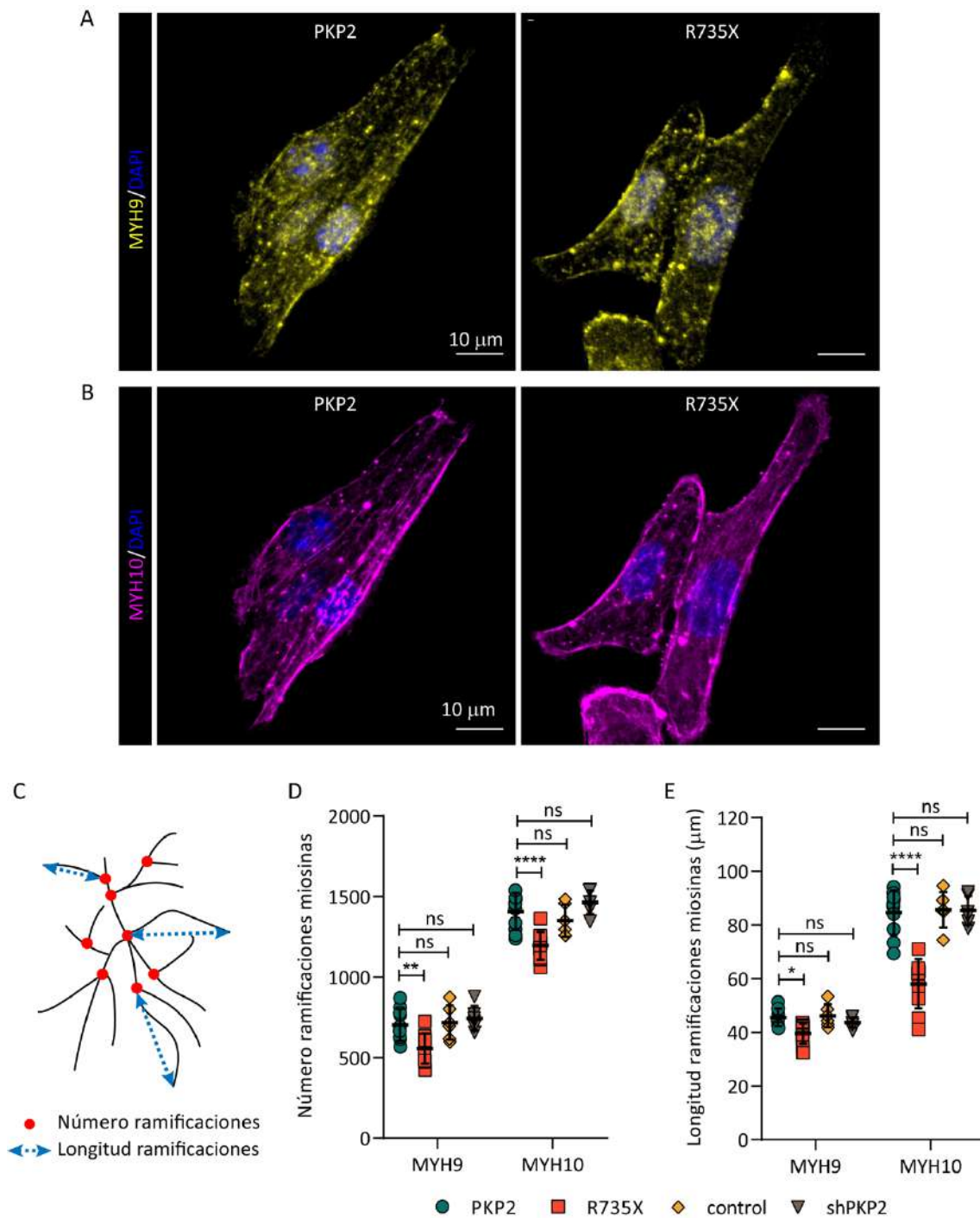


Figura 20. El mutante R735X compromete la estructura del citoesqueleto de la MYH9 y MYH10. A. Imágenes representativas de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de MYH9 (amarilla) y DAPI (azul) en células HL-1 que expresan PKP2 “wild-type” o R735X. **B.** Imágenes representativas de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de MYH10 (morada) y DAPI (azul) en células HL-1 que expresan PKP2 “wild-type” o R735X. Barra de escala= 10 µm. **C.** Diagrama que resume las mediciones que se realizaron: número de ramificaciones (señalados como puntos rojos) y longitud de dichas ramificaciones (señaladas con flechas azules). **D.** Cuantificación del número de ramificaciones en el citoesqueleto de MYH9 y MYH10 en células HL-1 control o que expresan PKP2, R735X o *shPKP2*. **E.** Cuantificación de la longitud de las

ramificaciones en el citoesqueleto de MYH9 y MYH10 en células HL-1 control o que expresan PKP2, R735X o *shPKP2*. Los datos, para D y E, se presentan como media \pm desviación estándar, ** $p > 0,01$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n=10$ para los grupos PKP2 y R735X y $n=6$ para los grupos control y *shPKP2*.

Para validar los resultados previos en tejido cardiaco, se aislaron cardiomiocitos de corazones de ratones adultos transducidos con AAV-*PKP2* o AAV-*R735X*. Las imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias, muestran que la distribución de la MYH9 (verde) y la MYH10 (rojo) por separado, es similar entre ratones inyectados con AAV-*PKP2* (Fig. 21A, panel superior) y con AAV-*R735X* (Fig. 21A, panel inferior). Sin embargo, un estudio de la distribución relativa de ambas proteínas de la distancia centro-centro (Fig. 21B panel izquierdo) y del porcentaje de colocalización (Fig. 21B, panel derecho) entre MYH9 y MYH10, muestra que la distancia centro-centro entre ambas proteínas es inferior en cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-*R735X* (Fig. 21D) y, por tanto, el porcentaje de colocalización aumenta (Fig. 21E). Estos datos, confirman que la presencia del mutante R735X, interfiere con la distribución relativa de las proteínas MYH9 y MYH10.

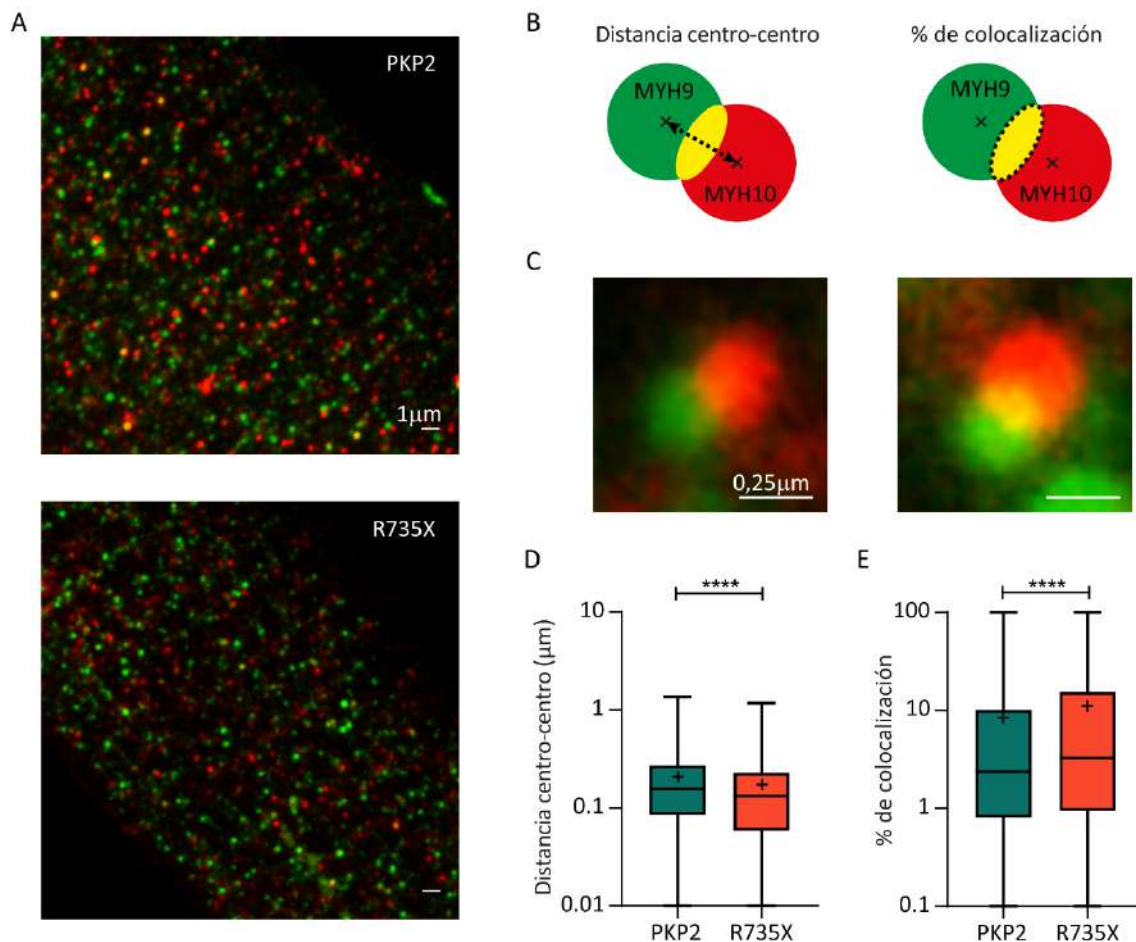


Figura 21. El mutante R735X altera la distribución de las MYH9 y MYH10 en cardiomiocitos de ratón adulto. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencias de MYH9 (verde) y MYH10 (rojo) en cardiomiocitos aislados de ratones inyectados con AAV que codifican para PKP2 (panel superior) o R735X (panel inferior). Barra de escala= 1 μ m. **B.** Esquemas que muestran las mediciones de la distancia centro-centro, señaladas con una flecha discontinua negra (panel izquierdo) y el porcentaje de colocalización, señalado con un óvalo punteado negro (panel derecho) entre MYH9 y MYH10. **C.** Imágenes de distintos grados de colocalización entre MYH9 y MYH10. Barra de escala= 0,25 μ m. **D.** Cuantificación de la distancia centro-centro entre MYH9 y MYH10. **E.** Cuantificación del porcentaje de colocalización entre MYH9 y MYH10. Los datos en D y E, se presentan como la mediana \pm los valores mínimos a máximos; la media está representada como "+", **** $p < 0,0001$ por prueba de *t*-Student, $n=2525$ para el grupo de cardiomiocitos AAV-PKP2 y $n=1935$ para el grupo de cardiomiocitos AAV-R735X. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo.

2.5. El mutante R735X altera el citoesqueleto de actina

Los resultados previos muestran que, tanto la presencia de la proteína mutante R735X, como el silenciamiento de la expresión de PKP2 (*shPKP2*), modifican la correcta localización subcelular de la actina. Para determinar si el mutante R735X afectaba a las propiedades del citoesqueleto de actina. Se analizaron y compararon imágenes de microscopía confocal de células que expresaban de forma estable PKP2 o R735X marcadas con faloidina. Las células que expresan PKP2 presentan un citoesqueleto de actina bien estructurado, con filamentos a lo largo de toda la célula (Fig. 22A). Sin embargo, en las células que expresan el mutante R735X, la mayoría de la actina aparece en acúmulos y el número de filamentos presente es menor, que en células que expresan PKP2 (Fig. 22B). Además, en la región sobre el núcleo de la célula (Fig. 22C) también se observa una disminución de la cantidad de filamentos de actina en las células que expresan el mutante R735X (Fig. 22D). Debido a que los cambios en el citoesqueleto de actina están íntimamente relacionados con la forma de la célula, se analizaron imágenes transversales (Fig. 22E) en las que se observa que la altura de las células se reduce en las células que expresan el mutante R735X (Fig. 22F). En las células HL-1 en las que se silencia la expresión de PKP2 (*shPKP2*), la estructura del citoesqueleto de actina no está alterada, por lo que no hay diferencias significativas en la cantidad de filamentos de actina sobre la región del núcleo (Fig. 22D) ni en la altura celular (Fig. 22F).

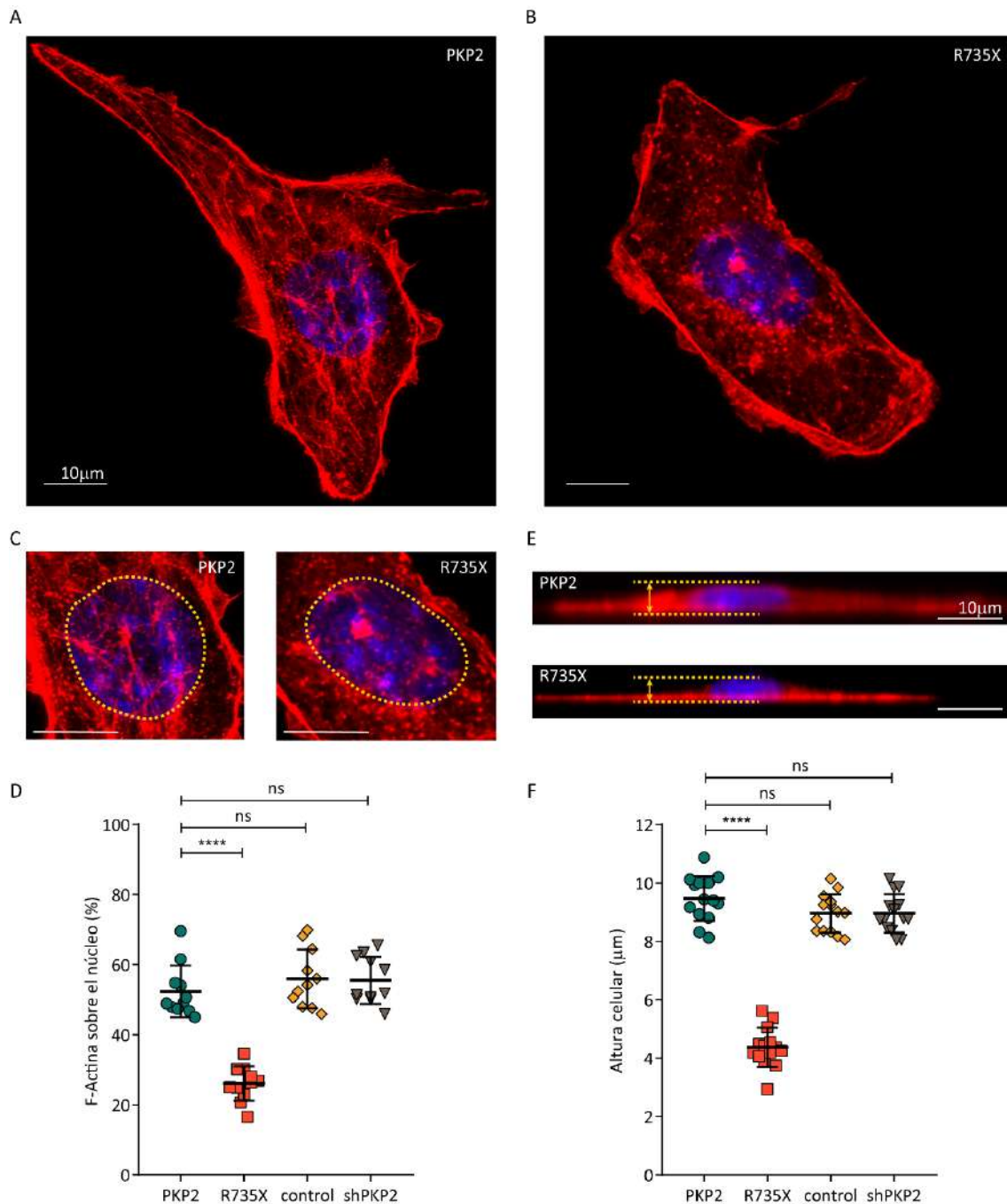


Figura 22. El mutante R735X altera la estructura del citoesqueleto de actina. A y B. Imágenes representativas de microscopía confocal de células HL-1 que expresan de forma estable PKP2 o R735X, respectivamente, marcadas con faloidina (rojo) y DAPI (azul). Barra de escala= 10 μm . **C.** Imágenes ampliadas de la región sobre el núcleo en células que expresan PKP2 (panel izquierdo) o R735X (panel derecho). La línea discontinua amarilla indica la región en la que se midió la cantidad de filamentos de actina sobre el núcleo. Barra de escala= 10 μm . **D.** Cuantificación de la cantidad de filamentos de actina en la región sobre del núcleo en células HL-1 control o que expresan PKP2, R735X o *shPKP2*. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n = 11$ para cada grupo. **E.** Imágenes transversales

representativas de células HL-1 que expresan PKP2 (panel superior) o R735X (panel inferior) marcadas con faloidina (rojo) y DAPI (azul). La flecha amarilla indica la altura celular. Barra de escala= 10 μ m. **F.** Cuantificación de la altura celular en células HL-1 control o que expresan PKP2, R735X o *shPKP2*. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n = 14$ para cada grupo.

Otro parámetro que se empleó para medir los cambios en la organización de los filamentos de actina fue el ratio F-Actina: G-Actina en células HL-1 control o que expresaban de forma estable PKP2, R735X o *shPKP2*. La cuantificación por western blot (Fig. 23A) mostró que la expresión del mutante R735X, modifica el ratio F-Actina: G-Actina, es decir, presenta menos actina en forma de filamentos y más actina monomérica o despolimerizada (Fig. 23B). Estos resultados indican que la alteración en la organización del citoesqueleto de actina se debe a la presencia de la proteína mutante R735X pero no a una disminución en la cantidad de proteína PKP2.

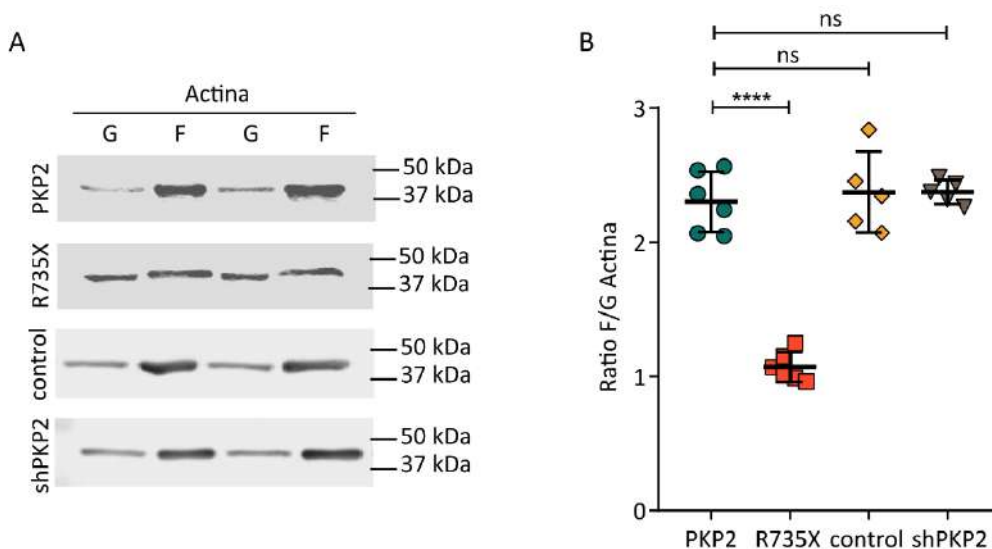


Figura 23. La expresión del mutante R735X modifica el ratio F-actina: G-Actina. **A.** Western blot de actina monomérica o G-actina (G) y de actina que forma filamentos o F-actina (F) en células HL-1 control o que expresan PKP2, R735X o *shPKP2*, utilizando un anticuerpo frente a β -Actina **B.** Cuantificación del ratio F-actina: G-actina en células HL-1 control o que expresan PKP2, R735X o *shPKP2*. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n = 6$ para los grupos PKP2 y R735X y $n = 5$ para los grupos control y *shPKP2*.

La proteína mutante R735X altera la estructura del citoesqueleto de actina, por tanto, se estudió si estos cambios en la organización de los filamentos de actina, tenían consecuencias funcionales y modificaban las propiedades biomecánicas de la célula. Se determinó la rigidez del citoesqueleto de actina, usando microscopía de fuera atómica (AFM del inglés, "atomic force

microscopy”) en células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2 “*wild-type*” o el mutante R735X. En estos experimentos se empleó una sonda que permite aplicar una fuerza constante conocida sobre la superficie celular y medir la fuerza que genera la superficie de las células en respuesta a esta deformación (Fig. 24A). Los mapas de fuerza que se obtuvieron, representan la variación espacial del módulo de Young como medida de la rigidez de las células (Fig. 24B). El análisis de los mapas de fuerza, muestra que las células que expresan el mutante R735X presentan valores del módulo de Young menores, lo que se traduce en una menor rigidez, comparado con las células que expresan PKP2 “*wild-type*” (Fig. 24C). Estos datos sugieren que una desorganización de los filamentos de actina debida a la presencia de la mutación R735X, conlleva una alteración en las propiedades biomecánicas del citoesqueleto en estas células.

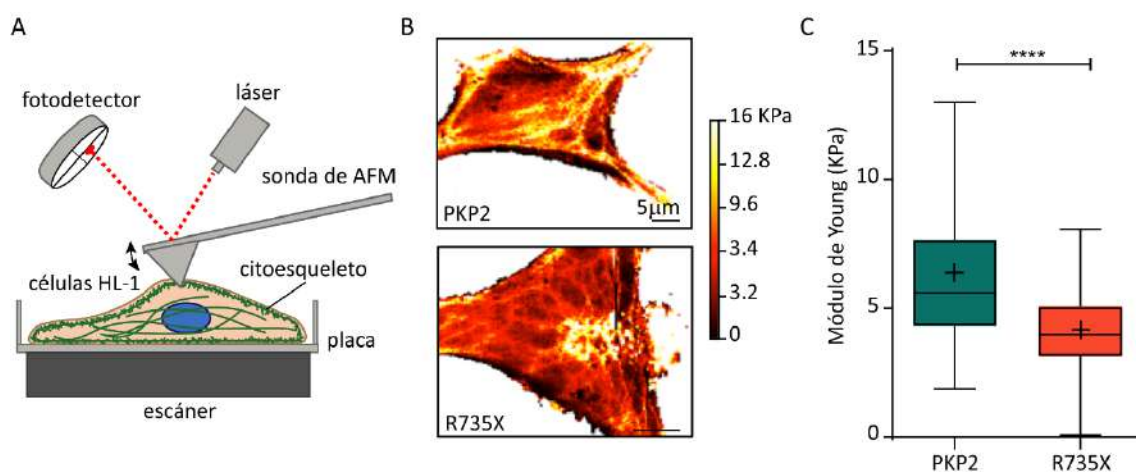


Figura 24. La expresión del mutante R735X modifica la rigidez del citoesqueleto de actina. A. Diagrama del funcionamiento del AFM. **B.** Mapas de fuerza representativos de células HL-1 que expresan PKP2 (panel superior) o R735X (panel inferior), mostrando el módulo de Young. Barra de escala= 5 μm. **C.** Cuantificación de los valores del módulo de Young. Los datos se presentan como la mediana ± los valores mínimos a máximos; la media está representada como “+”; **** p<0,0001 por prueba t-Student; n=93134 para PKP2 (en 5 células) y n=8080 para R735X (en 6 células).

Adicionalmente, se utilizó un biosensor basado en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) para detectar diferencias en la tensión de los filamentos de actina. Este biosensor cpstFRET (Guo et al., 2014), consta de un núcleo FRET Cerulean-Venus, que permite la transferencia de energía entre fluorocromos, unido a dos monómeros de actina (AcpA) (Fig. 25A). Estos monómeros de actina son funcionales y pueden polimerizar con los filamentos de actina celulares. Una vez forman parte de los filamentos, la tensión a la que se someten se refleja en cambios en la posición relativa de esta pareja de monómeros de actina, que a su vez afecta a la disposición del núcleo FRET y a su eficiencia. Si la tensión que soporta el filamento de actina

es reducida, permite que los fluorocromos del núcleo FRET permanezcan próximos. Esto se traduce en una capacidad de FRET máxima. En respuesta a un incremento en la tensión en los filamentos de actina, la estructura del núcleo FRET se altera. Este cambio estructural provoca que la distancia entre Cerulean-Venus se incremente y como consecuencia se reduzca la capacidad de transferencia de energía dentro del núcleo FRET. Para definir el rango de tensión cuantificable por parte del biosensor cpstFRET, se utilizaron dos construcciones como control positivo (cpA, valor máximo de FRET) y negativo (Cerulean-Actina, valor mínimo de FRET) (Fig. 25A). Se transfectaron células HL-1 que expresaban de forma estable PKP2 “*wild-type*” o el mutante R735X con las construcciones AcpA, cpA y Cerulean-Actina, y se obtuvieron imágenes Ratio FRET, que fueron el resultado de la relación entre la emisión obtenida por el fluorocromo Venus, y la emisión obtenida por el fluorocromo Cerulean (Fig. 25B). El análisis de las imágenes Ratio FRET muestra que en células transfectadas con cpA o Cerulean-Actina, no hay diferencias significativas entre las células que expresan PKP2 y las que expresan el mutante R735X. Sin embargo, en las células transfectadas con el biosensor de tensión AcpA, se observa que la expresión del mutante R735X incrementa el ratio FRET en comparación con las células que expresan PKP2 “*wild-type*” (Fig. 25C). Por tanto, la eficiencia de FRET es mayor en las células que expresan el mutante R735X (Fig. 25D), indicando que la tensión mecánica a la que están sometidos los filamentos de actina es menor en estas células (Fig. 25E). Estos resultados confirman que la presencia del mutante R735X, altera las propiedades biomecánicas del citoesqueleto de actina, afectando a la elasticidad y la tensión de los filamentos de actina.

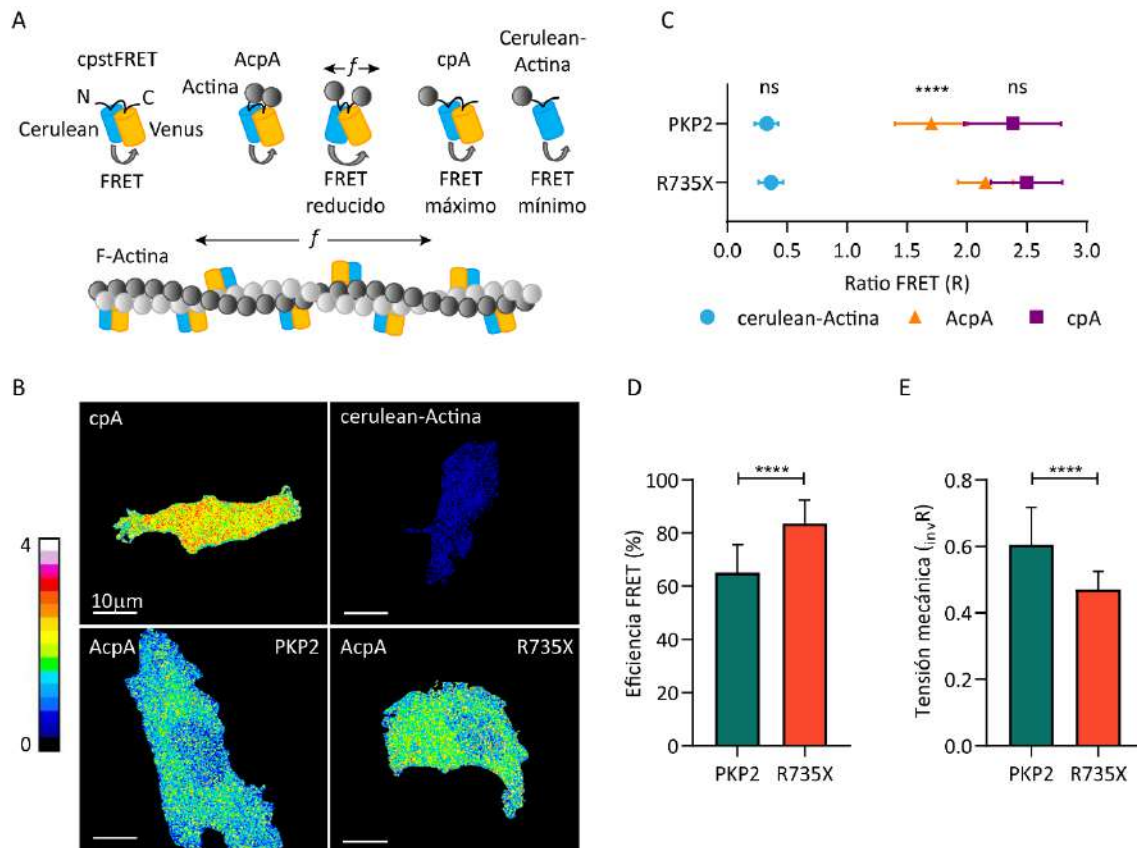


Figura 25. El mutante R735X modifica la tensión de los filamentos de actina. **A.** Diagrama de las construcciones generadas a partir del sensor que responde a tensión, cpsFRET: AcpA, cpA (FRET máximo) y cerulean-Actina (FRET mínimo). f indica fuerza, que expande la estructura de cpstFRET y conduce a una disminución del FRET. Las construcciones se incorporan a los filamentos de actina, polimerizando con ellos. **B.** Imágenes FRET representativas de células HL-1 que expresan PKP2 o R735X transfectadas con cpA (panel superior izquierdo), cerulean-Actina (panel superior derecho) o AcpA (paneles inferiores). Barra de escala= 10 μm . **C.** Análisis del ratio FRET (R) obtenido de las células que expresan PKP2 o R735X transfectadas con cada una de las construcciones cpstFRET. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n=25$ para cada grupo. **D.** Cuantificación de la eficiencia de FRET para la construcción AcpA transfectada en células que expresan PKP2 o R735X. **E.** Análisis de la tensión mecánica de los filamentos de actina en células que expresan PKP2 o R735X. Los datos en D y E, se presentan como media \pm desviación estándar, **** $p < 0,0001$ por prueba de t -Student, $n=25$ para cada grupo.

Para estudiar las consecuencias de estos cambios sobre el citoesqueleto de actina *in vivo*, se aislaron cardiomiocitos de corazones de ratones adultos control o inyectados con AAV que codificaban para PKP2, R735X o *shPKP2*. El análisis de imágenes de microscopía confocal de cardiomiocitos marcados con faloidina (Fig. 26A), muestra que no hay diferencias en la distribución de la actina del sarcómero entre ninguno de los grupos analizados (Fig. 26B). Esto

sugiere que ni la presencia de la mutación R735X, ni el silenciamiento de la expresión de *PKP2* (*shPKP2*), provocan cambios en la estructura de los filamentos de actina en los sarcómeros.

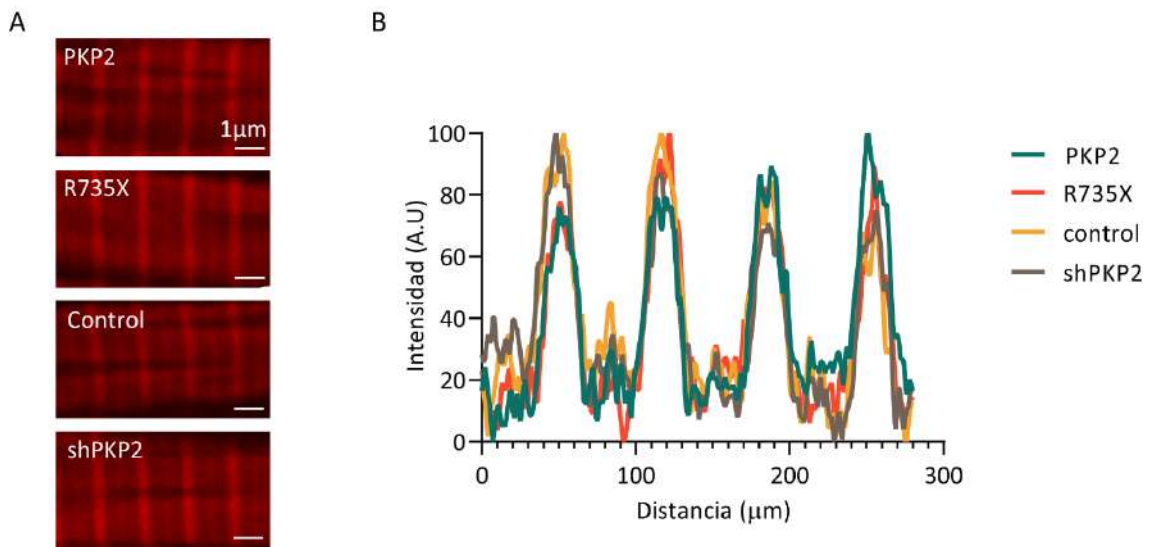
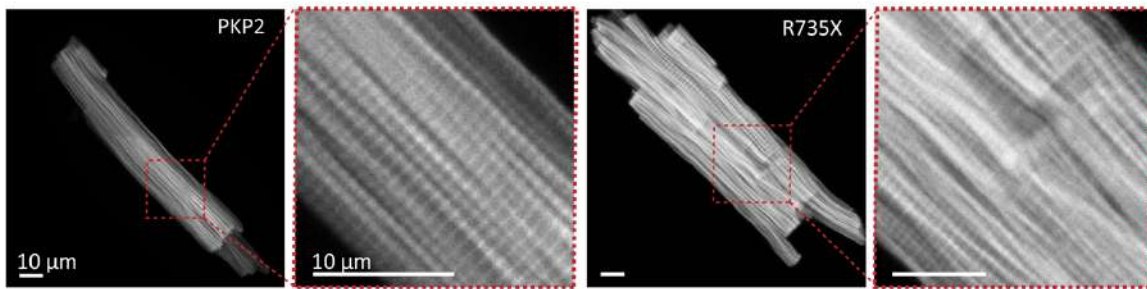


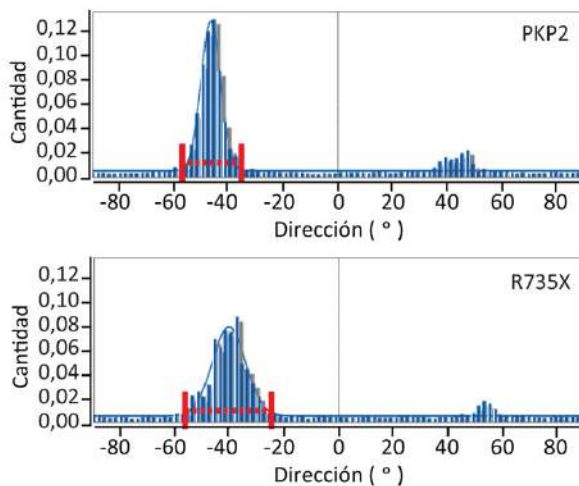
Figura 26. El mutante R735X no altera la distribución de la actina en los sarcómeros de cardiomiocitos aislados. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de cardiomiocitos aislados de ratones control o inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* o AAV-*shPKP2*, marcados con faloidina. Barra de escala= 1 μm. **B.** Perfiles de intensidad del patrón de tinción de la faloidina en cardiomiocitos aislados de ratones control o inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* o AAV-*shPKP2*. Los datos se presentan como la media de los datos normalizados, n=5 por grupo. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo.

Sin embargo, el patrón de estriación de los sarcómeros en los cardiomiocitos aislados de ratones inyectados con AAV-*R735X*, es anómalo y no siguen un patrón ordenado (Fig. 27A). Analizando la orientación relativa de la estriación de la actina, los histogramas de los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-*PKP2*, muestran patrones ordenados, en los que la mayoría de los sarcómeros mantienen la misma orientación (Fig. 27B, panel superior), mientras que en cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-*R735X*, los patrones son menos estructurados, y la mayoría de los sarcómeros se desvían de una dirección principal de la estructura (Fig. 27B, panel inferior). La cuantificación del valor de dispersión (σ) confirma que los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-*R735X*, presentan una dispersión más alta y, por tanto, sarcómeros más desestructurados (Fig. 27C). En el resto de grupos no se observan diferencias significativas al analizar este parámetro (Fig.27C), lo que sugiere que, aunque no hay cambios en la distribución de los filamentos de actina en los sarcómeros en presencia del mutante R735X, la variación en la orientación de los sarcómeros podría afectar a la eficiencia de contracción *in vivo*.

A



B



C

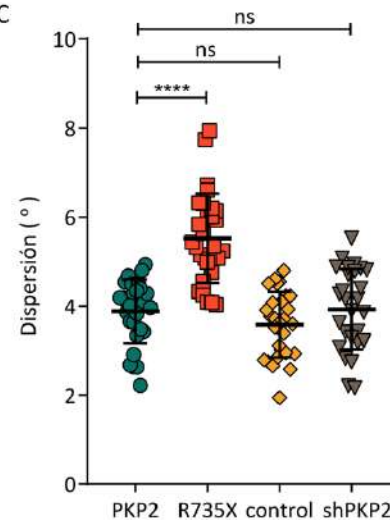


Figura 27. Los cardiomiocitos de ratones transducidos con AAV-R735X presentan una distribución sarcomérica desordenada. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de cardiomiocitos aislados de ratones inyectados con AAV-*PKP2* (paneles izquierdos) o AAV-*R735X* (paneles derechos), marcados con faloidina. La imagen ampliada aparece identificada con un cuadrado de línea discontinua. Barra de escala= 10 μm . **B.** Histogramas representativos de la medición de la orientación de los sarcómeros de cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-*PKP2* (panel superior) o AAV-*R735X* (panel inferior). Las barras punteadas rojas indican la dispersión de la distribución. **C.** Cuantificación de la dispersión (σ) de los sarcómeros de cardiomiocitos de ratones control o de ratones inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* o AAV-*shPKP2*. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n=29$ para los grupos *PKP2* y *R735X* y $n=28$ para los grupos control y *shPKP2*. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo.

Para determinar si la variación en la alineación de los sarcómeros se asocia con una alteración en la actina citoplasmática (ACTB), se analizó el ratio F-Actina: G-Actina en cardiomiocitos aislados de ratones control o inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* y AAV-*shPKP2*. La cuantificación por western blot muestra que los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-*R735X* presentan un ratio F-Actina: G-Actina menor respecto a los cardiomiocitos de ratones

inyectados con AAV-*PKP2* (Fig. 28). No se observaron diferencias significativas entre los restantes grupos analizados (Fig. 28). Estos resultados sugieren que la expresión del mutante R735X en cardiomiocitos de ratón adulto, afecta a la actina citoplasmática alterando el ratio F-Actina: G-Actina, y la orientación de los sarcómeros, aunque no modifica la distribución de la actina sarcomérica (ACTA). Por otra parte, el silenciamiento de la expresión de *PKP2*, no modifica ninguno de estos parámetros, reforzando la idea de que el mutante R735X actúa como un mutante con ganancia de función sobre la regulación de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina y no, generando un fenotipo de haploinsuficiencia.

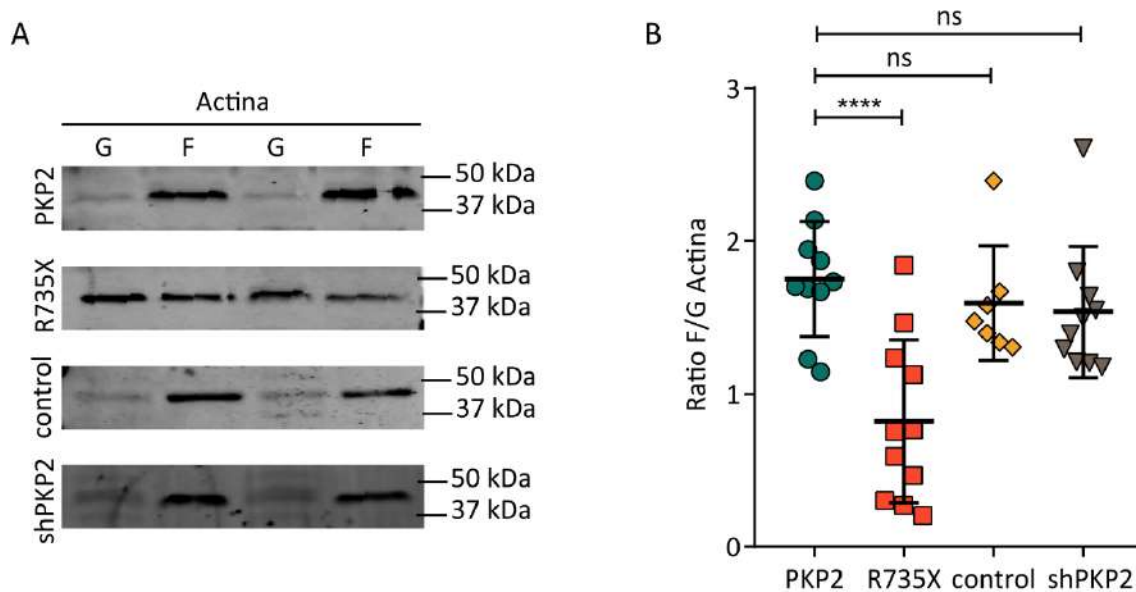


Figura 28. La expresión del mutante R735X en cardiomiocitos altera el ratio F-actina: G-Actina. A. Western blot de G-actina (G) y F-actina (F) en cardiomiocitos de ratones control o inyectados con AAV-*PKP2*, AAV-*R735X* o AAV-*shPKP2*, utilizando un anticuerpo frente a β -Actina. **B.** Cuantificación del ratio F-actina: G-actina. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnet, $n = 10$ para los grupos *PKP2* y *shPKP2*; $n = 11$ para el grupo *R735X* y $n = 7$ para el grupo control. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo.

2.6. El mutante R735X altera el citoesqueleto de actina a través de su efecto sobre la MYH10

La MYH9 y MYH10, son fundamentales para un correcto ensamblaje del citoesqueleto de actina, así como para el mantenimiento de la tensión y los movimientos contráctiles de los filamentos (Brito & Sousa, 2020; Sellers & Heissler, 2019). Para determinar si los defectos observados en el

citoesqueleto de actina dependían directamente del efecto del mutante R735X sobre la MYH10, se utilizaron activadores específicos para dicha miosina, Kif26b y 4-Hidroxiacetofenona (4-HAP), y un inhibidor, Blebistatina. Las imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de MYH9 y MYH10 en células HL-1 que expresan de forma estable el mutante R735X, muestran una mejora en la distribución de la MYH9 y la MYH10 al emplear Kif26b y 4-HAP (Fig. 29A). En el análisis se observa que, el uso de ambos activadores incrementa el número de ramificaciones y la longitud de las mismas, tanto para la MYH10 como para la MYH9 (Fig. 29B), pero el efecto es mayor en las células que expresan el mutante R735X. Con el uso de la Blebistatina, se observa el efecto opuesto, una desestructuración del citoesqueleto de MYH9 y MYH10, disminuyendo el número de ramificaciones y su longitud (Fig. 29B y 29C).

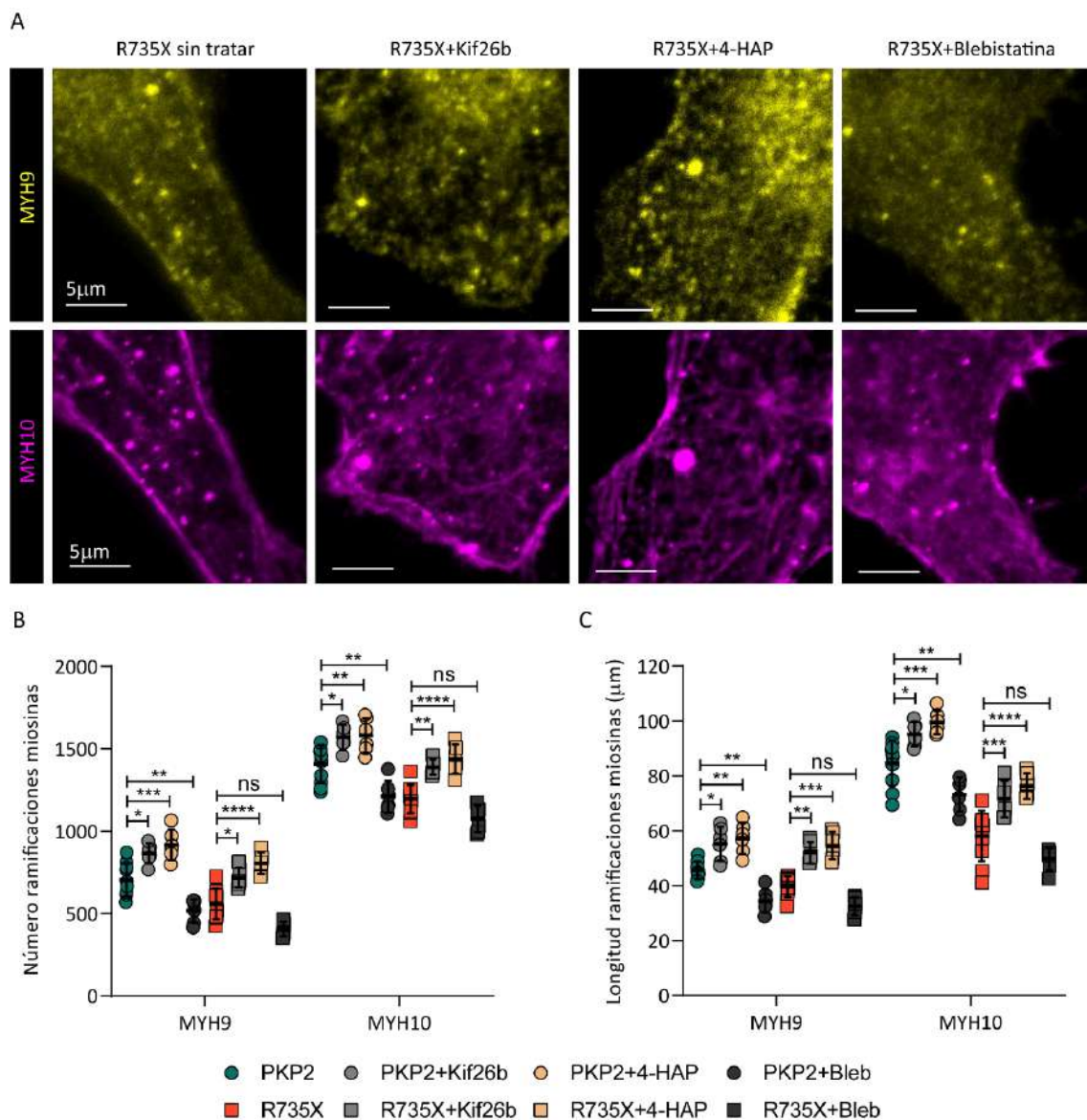


Figura 29. Los activadores específicos de MYH10, Kif26b y 4-HAP, mejoran la estructura del citoesqueleto de MYH9 y MYH10. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de la inmunofluorescencia de MYH9 (amarillo) y MYH10 (morado) de células HL-1 que expresan el mutante R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP o Blebistatina. Barra de escala= 5 μ m. **B.** Cuantificación del número de ramificaciones en el citoesqueleto de MYH9 y MYH10 en células HL-1 que expresan PKP2 o el mutante R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP o Blebistatina. **C.** Cuantificación de la longitud de las ramificaciones en el citoesqueleto de MYH9 y MYH10 en células HL-1 que expresan PKP2 o el mutante R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP o Blebistatina. Los datos para B y C, se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n=10$ para los grupos PKP2 y R735X sin tratar y $n=6$ para los grupos PKP2 y R735X tratadas con Kif26b, 4-HAP o Blebistatina.

Posteriormente las células se marcaron con faloidina para determinar si los cambios en la estructura del citoesqueleto de las MYH9 y MYH10 se correlacionaban con una mejora en la estructura del citoesqueleto de actina. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal, muestran un incremento en el número de filamentos de actina a lo largo de toda la célula, en las células que expresan el mutante R735X tratadas con Kif26b y con 4-HAP (Fig. 30A). La cuantificación mostró un incremento en la cantidad de filamentos de actina sobre la región del núcleo (Fig. 30B) y en la altura celular (Fig. 30C), al utilizar los dos activadores de la MYH10 en las células que expresan el mutante R735X. El tratamiento con la Blebistatina tuvo el efecto contrario. Además, los activadores de MYH10, también incrementan el ratio F-Actina: G-Actina, en células que expresan el mutante R735X (Fig. 30D y 30E). Por tanto, el tratamiento con moduladores de la actividad de la MYH10 conlleva cambios en la estructura del citoesqueleto de actina, que rescata el fenotipo inducido por la presencia del mutante R735X, lo que sugiere que la proteína mutante R735X altera la estructura del citoesqueleto de actina modificando la función de la proteína MYH10.

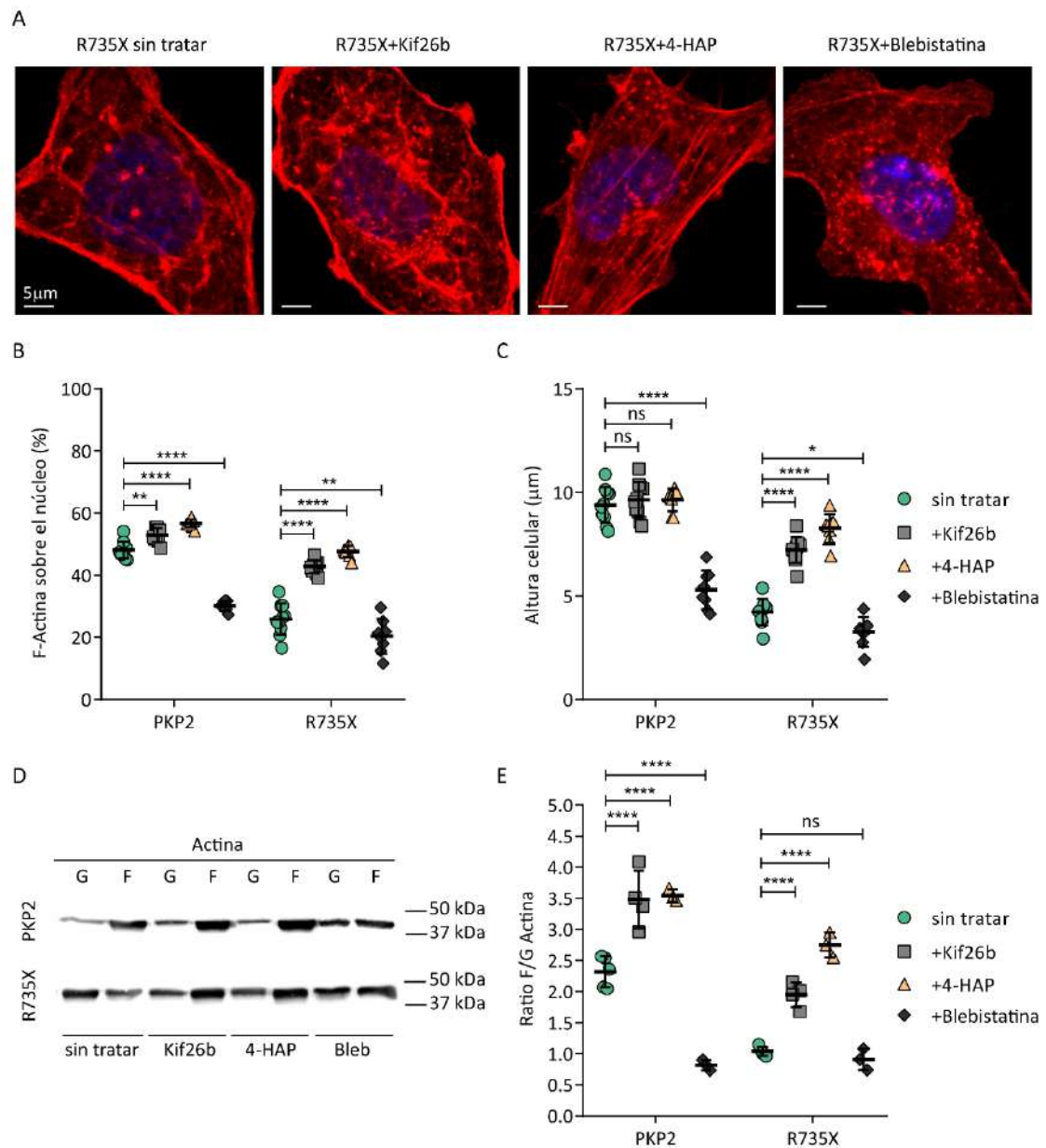


Figura 30. Los activadores específicos de MYH10, Kif26b y 4-HAP, mejoran la estructura del citoesqueleto de actina en células HL-1 que expresan el mutante R735X. A. Imágenes representativas de microscopía confocal de células HL-1 que expresan de forma estable el mutante R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP o Blebistatina, marcadas con faloidina (rojo) y DAPI (azul). Barra de escala= 5 μm . **B.** Cuantificación de la cantidad de filamentos de actina en la región sobre del núcleo en células HL-1 que expresan PKP2 o R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP oBlebistatina. **C.** Análisis de la altura celular en células que expresan PKP2 o R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP oBlebistatina. Los datos en B y C se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n=10$ para los grupos PKP2 y R735X sin tratar y tratadas con Kif26b y $n=8$ para los grupos PKP2 y R735X tratadas con 4-HAP o Blebistatina. **D.** Western blot de G-actina (G) y F-actina (F) en células HL-1 que expresan PKP2 o R735X, sin tratar o tratadas con Kif26b, 4-HAP o Blebistatina, utilizando un anticuerpo frente a β -Actina.

E. Cuantificación del ratio F-actina: G-actina. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p>0,05$; **** $p<0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n=5$ para los grupos PKP2 y R735X sin tratar, $n=4$ para los grupos PKP2 y R735X tratadas con Kif26b y $n=3$ para los grupos PKP2 y R735X tratadas con 4-HAP o Blebistatina.

3. El cambio estructural de la proteína R735X es crítico en su ganancia de función

3.1. Ocluir estéricamente la región interna en la proteína R735X, estabiliza el dominio N-terminal y mejora su localización

La delección de la región C-terminal de PKP2 induce un cambio conformacional en la proteína, que provoca que una región interna quede expuesta al solvente. Se hipotetizó que este cambio podía estar implicado en la adquisición de nuevas funciones de la proteína mutante R735X. Ocluir esta región, podría ser importante para poder revertir el fenotipo asociado a la expresión del mutante R735X y la desregulación del citoesqueleto de actomiosina. Siguiendo predicciones *in silico*, se diseñaron construcciones para expresar la proteína de fusión R735X-EGFP, donde la proteína EGFP en el extremo C-terminal de la proteína mutante R735X (R735X-Ctag) ocluía estéricamente la región interna de la proteína R735X. El modelo tridimensional correspondiente a la estructura de la proteína R735X-Ctag, confirmó que el péptido EGFP estabiliza el dominio N-terminal y ocluye parcialmente la región interna expuesta en la estructura de la proteína mutante R735X (Fig. 31A). Esta proteína de fusión, R735X-Ctag, expresada en células HL-1 es más estable que la proteína mutante R735X, como muestra el análisis por western blot (Fig. 31B). El análisis de la localización de la proteína R735X-Ctag, muestra que en células HL-1, la proteína R735X-Ctag, se localiza en el borde de la célula, aunque también se detecta en el citoplasma (Fig. 31C). La cuantificación de la intensidad relativa de la señal de R735X y de R735X-Ctag en la membrana plasmática y en el citoplasma, demuestra que el ratio de la intensidad membrana/citoplasma, se incrementa en las células que expresan la proteína R735X-Ctag respecto a las células que expresan la proteína mutante R735X (Fig. 31D). *In vivo*, las imágenes de inmunohistoquímicas de corazones de ratones transducidos con AAV, muestran que la proteína R735X-Ctag se localiza tanto en el citoplasma de los cardiomiocitos, como en los discos intercalares, mejorando su localización respecto a la proteína mutante R735X (Fig. 31E). En conjunto, estos resultados sugieren que, la oclusión parcial de la región interna que queda

expuesta en la proteína mutante R735X con el péptido EGFP (R735X-Ctag), mejora parcialmente la estabilidad y la localización de la proteína.

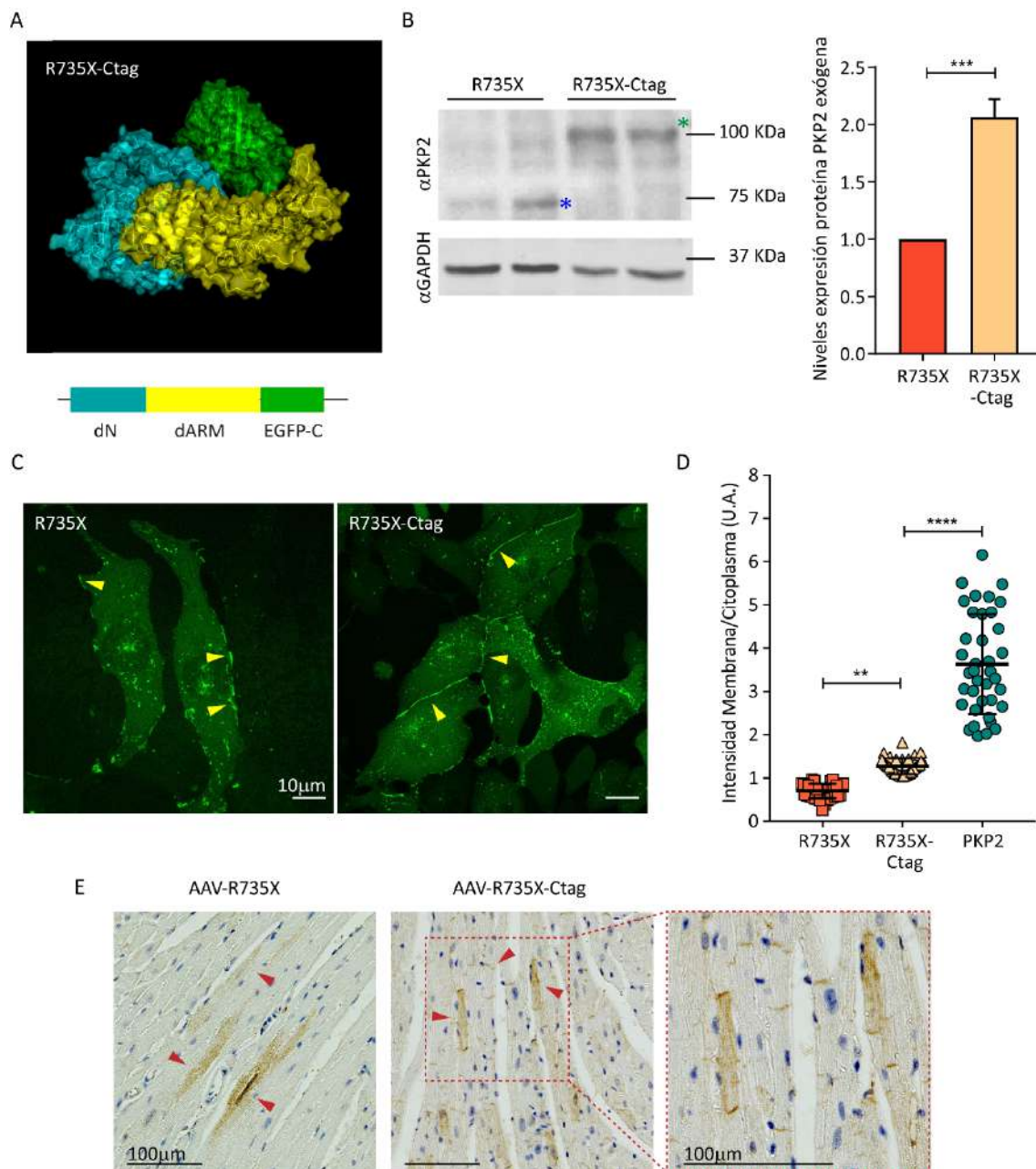


Figura 31. La proteína R735X-Ctag presenta mayor estabilidad y mejor localización que la proteína mutante R735X. **A.** Estructura tridimensional y organización de los dominios de la proteína R735X-Ctag. Dominio N-terminal, dN (azul); dominio interno armadillo, dARM (amarillo); EGFP en el extremo C-terminal, EGFP-C (verde). **B.** Western blot de células HL-1 que expresan de forma estable R735X o R735X-Ctag, utilizando anticuerpos frente a PKP2 y GAPDH (paneles izquierdos). R735X \approx 70 KDa (asterisco azul) y R735X-Ctag \approx 98 KDa (asterisco verde). Cuantificación de los niveles de las proteínas R735X y R735X-Ctag (panel derecho). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar; *** $p < 0,001$ por prueba *t*-Student, $n = 3$ para cada grupo. **C.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células HL-1 que

expresan de forma estable EGFP-R735X (panel izquierdo) o R735X-Ctag (panel derecho). Las flechas amarillas indican la localización de R735X o R735X-Ctag, respectivamente, en el borde celular. Barra de escala= 10 μ m. **D.** Cuantificación de los niveles de intensidad de R735X, R735X-Ctag y PKP2 en la membrana plasmática respecto a los niveles en el citoplasma. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey. R735X $n=39$, R735X-Ctag $n=37$ y PKP2 $n=38$. **E.** Imágenes representativas de cortes de tejido cardiaco de ratones inyectados con AAV-EGFP-R735X (panel izquierdo) o AAV-R735X-Ctag (panel central y derecho). Las flechas rojas indican la tinción por inmunohistoquímica de EGFP, mostrando la localización de cada proteína en los cardiomiocitos infectados. La imagen del panel derecho muestra la amplificación de un área específica. Barra de escala= 100 μ m.

3.2. La proteína R735X-Ctag mejora la estructura del citoesqueleto de actomiosina respecto al mutante R735X

Ocluir la zona interna expuesta en el mutante R735X, rescata parcialmente la estabilidad y la localización de la proteína. Para determinar si este cambio estructural generado al ocluir la región interna del mutante R735X, altera la interacción de R735X-Ctag con la MYH9 y la MYH10, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos *pCMV-EGFP-R735X*, *pCMV-R735X-EGFP* (R735X-Ctag) o *pCMV-EGFP* y se realizó una Co-IP. El análisis por western blot (Fig. 32A) muestra que la MYH9 coinmunoprecipita por igual con ambas proteínas, sin embargo, la MYH10 coinmunoprecipita menos eficientemente con la proteína mutante R735X-Ctag (Fig. 32B). Estos resultados sugieren que el rescate parcial de la proteína R735X-Ctag, puede estar mediado por la interacción diferencial que se produce con la proteína MYH10.

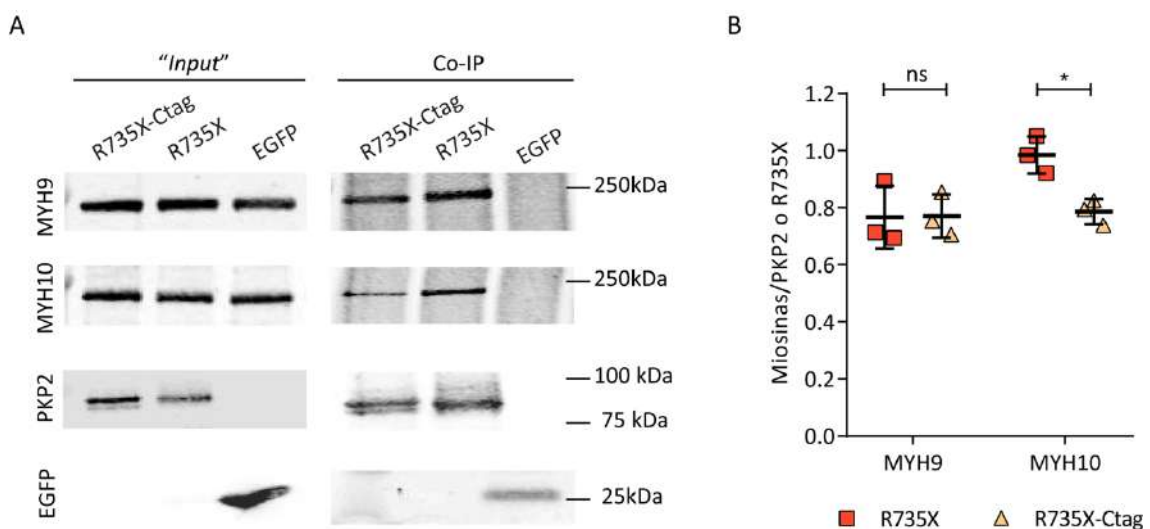


Figura 32. El cambio estructural de la proteína R735X-Ctag reduce la interacción con la MYH10. A. Western blot de la Co-IP de MYH9 y MYH10. Se muestran tanto los extractos de proteínas iniciales o “input” (paneles izquierdos), como los resultados de la Co-IP (paneles derechos). Se utilizaron anticuerpos frente a MYH9, MYH10 y EGFP. B. Cuantificación de la cantidad de proteína de MYH9 y MYH10, relativa a la cantidad de proteína R735X o R735X-Ctag. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n = 3$ para cada grupo.

Para determinar si la proteína R735X-Ctag rescataba también la organización de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina, se analizó la distribución subcelular de la MYH9, MYH10 y actina a nivel del córtex celular, en células HL-1 que expresaban R735X-Ctag (Fig. 33A). El análisis de los perfiles de intensidad a partir de imágenes de microscopía confocal, muestra que la localización de PKP2 (R735X-Ctag) (verde) coincide con el perfil de la actina (gris) en la zona más externa de la célula. Sin embargo, los perfiles de intensidad de la MYH9 (rojo) y MYH10 (azul) se encuentran desplazados hacia el interior celular (Fig. 33B). La cuantificación de las distancias relativas entre estas proteínas, usando como referencia la localización de la proteína PKP2 “wild-type”, muestra que la distribución en células que expresan R735X-Ctag, es similar a la observada en células que expresan PKP2 (Fig. 33C). Por tanto, la disposición de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina se recupera en presencia de la proteína R735X-Ctag, que tiene ocluida la región interna de la proteína. Además, se comprobó la estructura y disposición del citoesqueleto que conformaban las MYH9 y MYH10, analizando imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias de células HL-1 que expresaban de forma estable el mutante R735X o la nueva proteína R735X-Ctag. La cuantificación muestra que las células que expresan R735X-Ctag, presentan mayor número de ramificaciones (Fig. 33D) y de mayor longitud (Fig. 33E), tanto en MYH9 como en MYH10, respecto a las células que expresan el mutante R735X. Por tanto, estos resultados indican que la oclusión estérica de la región interna que se produce en la proteína R735X-Ctag, revierte parcialmente el fenotipo de la proteína mutante R735X, mejorando la distribución subcelular de los componentes de actomiosina y la estructura del citoesqueleto de MYH9 y MYH10.

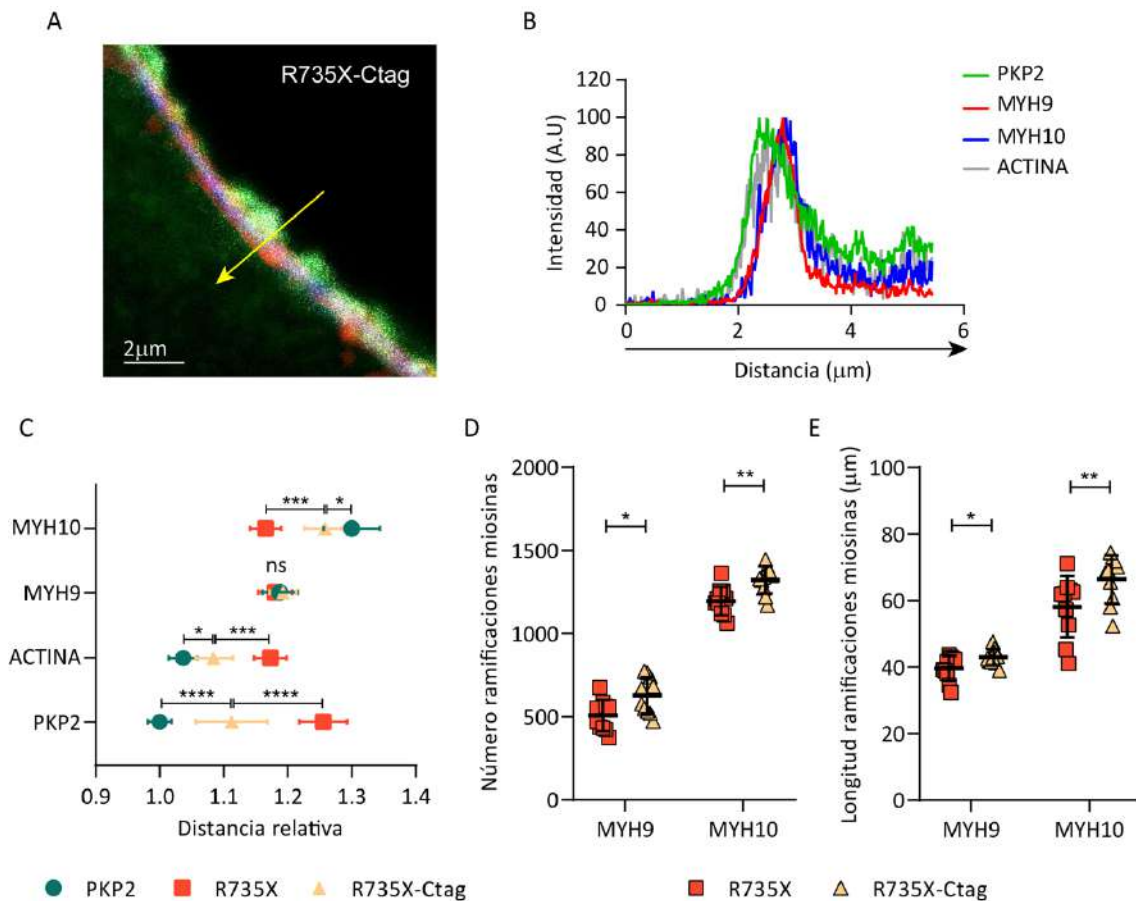


Figura 33. La proteína R735X-Ctag rescata parcialmente la localización y la distribución de la MYH9 y MYH10. **A.** Imagen representativa de microscopía confocal de inmunofluorescencia de R735X-Ctag (verde), MYH9 (rojo), MYH10 (azul) y Actina (gris) en células HL-1 que expresan de forma estable R735X-Ctag. La flecha amarilla está trazada desde el exterior de la célula hacia el citoplasma. Barra de escala= 2 μm . **B.** Perfil de intensidad medido siguiendo la dirección de la flecha amarilla, para PKP2 (R735X-Ctag), MYH9, MYH10 y Actina en el borde celular, mostrando el orden en el que aparece cada proteína en células que expresan R735X-Ctag. **C.** Gráfica que muestra la distancia relativa entre los picos máximos de intensidad de los perfiles de PKP2 (R735X o R735X-Ctag), MYH9, MYH10 y actina, en células HL-1 que expresan EGFP-PKP2, EGFP-R735X o R735X-Ctag. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Dunnett, $n=5$ para cada grupo. **D.** Cuantificación del número de ramificaciones en el citoesqueleto de MYH9 y MYH10 en células que expresan R735X o R735X-Ctag. **E.** Cuantificación de la longitud de las ramificaciones en el citoesqueleto de MYH9 y MYH10 en células que expresan R735X o R735X-Ctag. Los datos, para D y E, se presentan como media \pm desviación estándar, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ por ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $n=10$ para cada grupo.

Se estudió el efecto de la proteína R735X-Ctag sobre la organización y función del citoesqueleto de actina. El análisis de las imágenes de células HL-1 que expresaban de forma estable R735X-

Ctag, marcadas con faloidina muestra que estas células (Fig. 34A, panel superior) presentan un citoesqueleto de actina más estructurado que en las células que expresan el mutante R735X (Fig. 34A, panel inferior). Además, las células que expresan R735X-Ctag, también muestran un aumento de la cantidad de filamentos de actina en la región sobre el núcleo (Fig. 34B) y la altura celular (Fig. 34C). Adicionalmente, el análisis mediante western blot del ratio F-Actina: G-Actina (Fig. 34D), muestra un aumento de la cantidad de filamentos de actina (F-actina) respecto a la G-actina, en las células que expresan R735X-Ctag, comparado con las células que expresan el mutante R735X (Fig. 34E). Estos cambios estructurales se correlacionan con cambios funcionales, ya que en las células que expresan R735X-Ctag, las propiedades biomecánicas del citoesqueleto de actina se modifican con respecto a las células que expresan el mutante R735X. El análisis de la rigidez celular medido por AFM en células HL-1, muestra que los valores del módulo de Young se incrementan en las células que expresan R735X-Ctag respecto a las células que expresan el mutante R735X (Fig. 34F). Por tanto, estos resultados confirman que la región C-terminal es crítica para mantener un citoesqueleto funcional y que la oclusión estérica de la región interna de la proteína R735X, revierte parcialmente el fenotipo asociado a esta mutación patogénica.

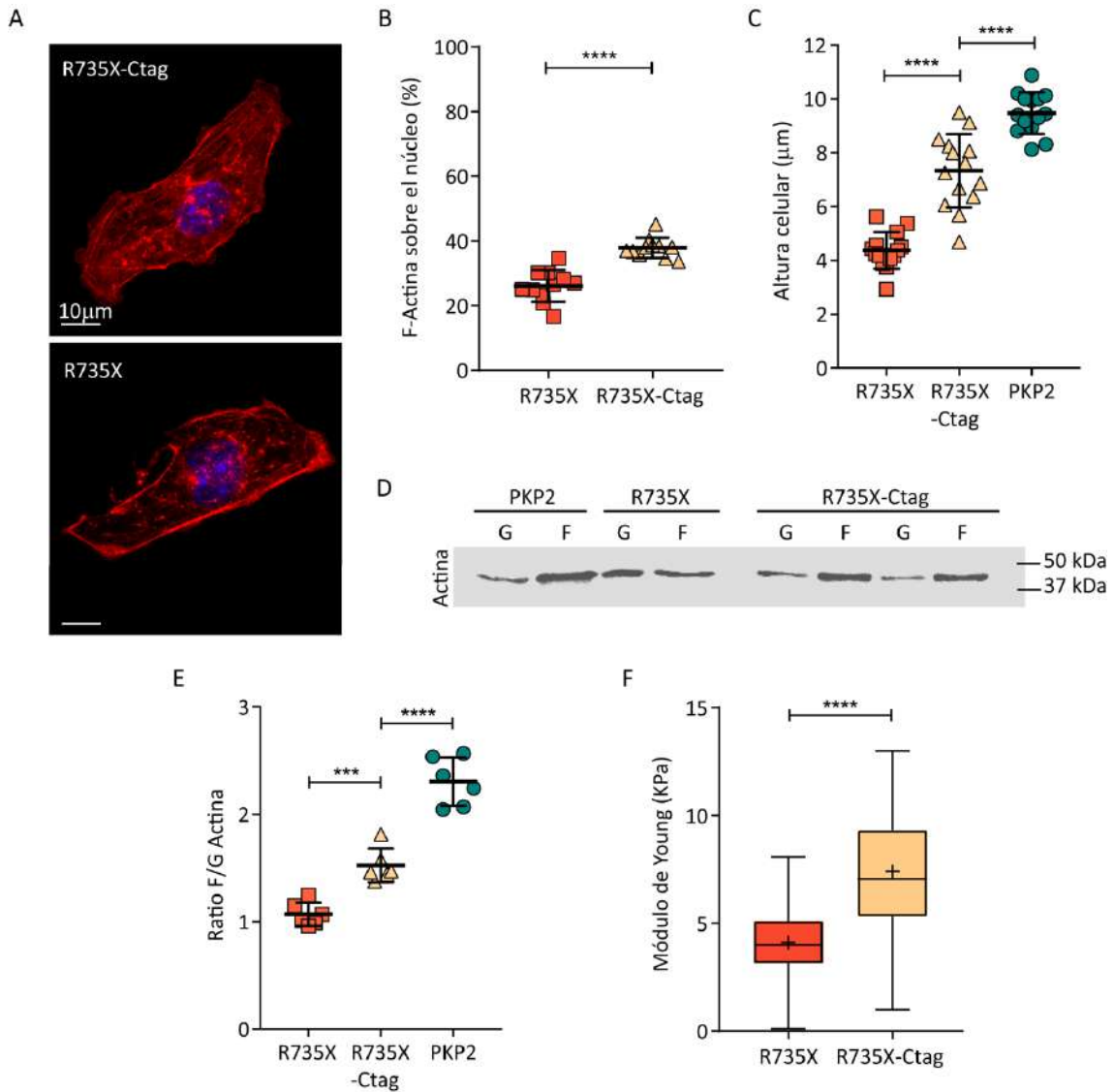


Figura 34. La proteína R735X-Ctag rescata defectos estructurales y funcionales del citoesqueleto de actina. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células HL-1 que expresan de forma estable R735X-Ctag (panel superior) o R735X (panel inferior), marcadas con faloidina (rojo) y DAPI (azul). Barra de escala= 10 µm. **B.** Análisis cuantitativo de la cantidad de filamentos de actina en la región sobre el núcleo en células HL-1 que expresan R735X o R735X-Ctag. Los datos se presentan como media ± desviación estándar, **** $p < 0,0001$ por prueba *t*-Student, $n=11$ para cada grupo. **C.** Análisis de la altura celular en células HL-1 que expresan R735X, R735X-Ctag o PKP2. Los datos se presentan como media ± desviación estándar, **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, $n=14$ para cada grupo. **D.** Western blot de G-actina (G) y F-actina (F) de células HL-1 que expresan PKP2, R735X o R735X-Ctag, utilizando un anticuerpo frente a β -Actina. **E.** Cuantificación del ratio F-actina: G-actina. Los datos se presentan como media ± desviación estándar, *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, $n=6$ para cada grupo. **F.** Cuantificación del módulo de Young en células HL-1 que expresan R735X o R735X-Ctag. Los datos se presentan como la mediana ± los valores mínimos a máximos; la media está representada como "+"; ****

$p < 0,0001$ por prueba *t*-Student; $n=8080$ para R735X (en 6 células) y $n=93134$ para R735X-Ctag (en 5 células).

3.3. La proteína R735X-Ctag mejora la función ventricular respecto al mutante R735X

Para determinar el efecto de la proteína R735X-Ctag *in vivo*, se transdujeron ratones con AAV-R735X o R735X-Ctag y se estudiaron a nivel estructural y funcional. El análisis de imágenes de inmunofluorescencias de MYH9 y MYH10 obtenidas por microscopía confocal, muestra que en los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-R735X-Ctag, se incrementa la distancia centro a centro entre la MYH9 y MYH10 (Fig. 35A) y, por tanto, se reduce su porcentaje de colocalización (Fig. 35B), cuando se comparan con los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-R735X. El análisis del ratio F-Actina: G-Actina también reveló que los cardiomiocitos de los ratones inyectados con AAV-R735X-Ctag, presentan un ratio mayor en comparación con los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-R735X (Fig. 35C). Este dato se correlaciona, con una disminución en la dispersión de la orientación de los sarcómeros en los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-R735X-Ctag presentando, por tanto, un patrón sarcomérico más ordenado, respecto a los cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-R735X (Fig. 35D). Además, el análisis de la función cardíaca medido por MRI, muestra que en ratones inyectados con AAV-R735X-Ctag, mejoran el VSF (Fig. 35E) y la FE (Fig. 35F) del ventrículo derecho, respecto a los ratones inyectados con AAV-R735X. Estos resultados indican que la expresión de R735X-Ctag, revierte parcialmente el fenotipo encontrado en los ratones que expresan el mutante R735X, mejorando la capacidad de contracción y la función cardíaca. Por tanto, la oclusión de la región interna que aparece expuesta en la proteína mutante R735X, es suficiente para recuperar parcialmente las propiedades estructurales del cardiomiocito. En conjunto, estos resultados sugieren que la mutación R735X, que afecta a la región C-terminal, presenta un desorden conformacional que afecta a la interacción y a la función de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina, interfiriendo en la organización de los filamentos de actina, la capacidad de contracción y la función del sarcómero.

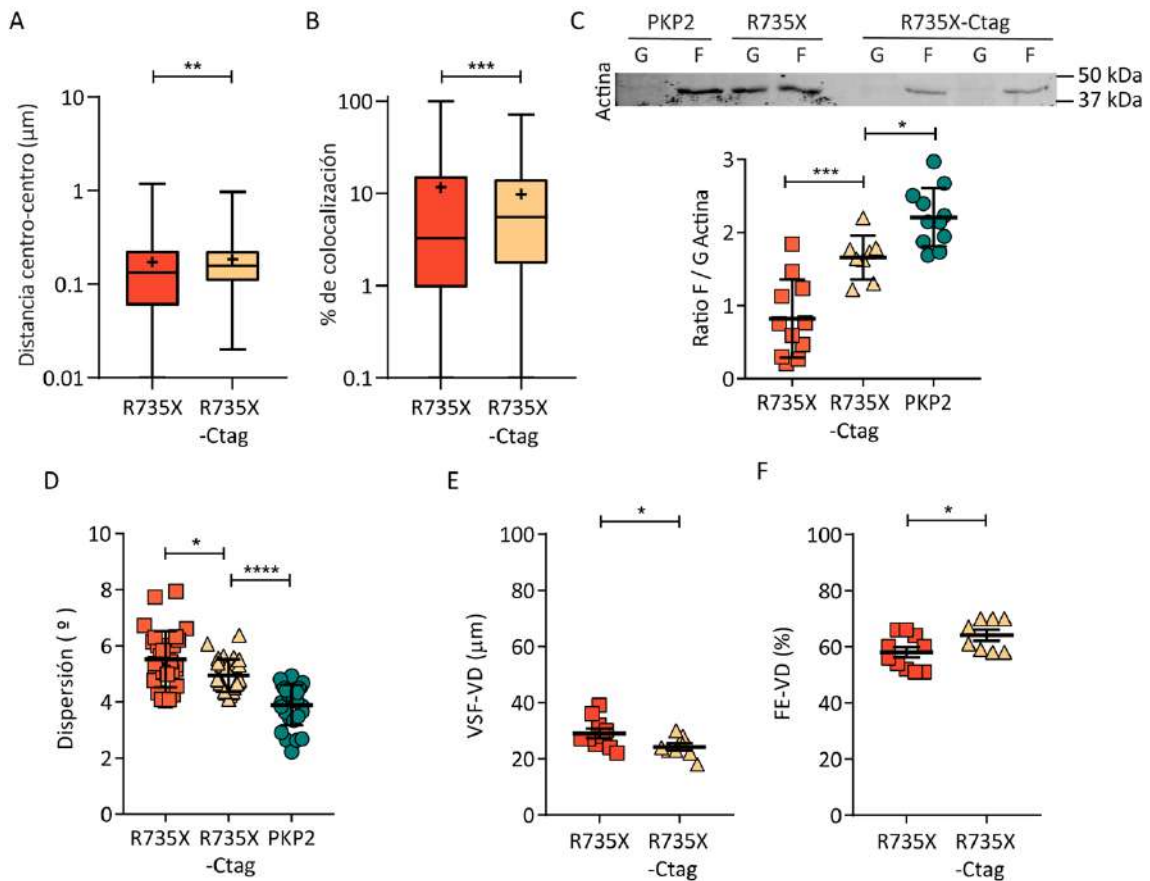


Figura 35. La proteína R735X-Ctag modifica la distribución de los componentes de actomiosina y la funcionalidad cardíaca. **A.** Cuantificación de la distancia centro-centro entre MYH9 y MYH10. **B.** Cuantificación del porcentaje de colocalización entre MYH9 y MYH10. Los datos en A y B, se presentan como la mediana \pm los valores mínimos a máximos; la media está representada como "+", ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ por prueba de t-Student, $n=1935$ para el grupo de cardiomiocitos AAV-R735X y $n=1999$ para el grupo de cardiomiocitos AAV-R735X-Ctag. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo. **C.** Western blot de G-actina (G) y F-actina (F) en cardiomiocitos de ratones inyectados con AAV-PKP2, AAV-R735X o AAV-R735X-Ctag (panel superior) utilizando un anticuerpo frente a β -Actina. Cuantificación del ratio F-actina: G-actina (panel inferior). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, $n=11$ para el grupo AAV-R735X; $n=8$ para el grupo AAV-R735X-Ctag y $n=10$ para el grupo AAV-PKP2. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo. **D.** Cuantificación de la dispersión (σ) de los sarcómeros de cardiomiocitos aislados marcados con faloidina, de ratones inyectados con AAV-R735X, AAV-R735X-Ctag o AAV-PKP2. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de una vía con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey, $n=29$ para cada grupo. Los datos se obtuvieron de al menos 3 ratones por grupo. **E y F.** Cuantificación mediante MRI del VSF y de la FE, respectivamente, en el ventrículo derecho, en corazones de ratones inyectados con AAV-R735X o AAV-R735X-Ctag. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, * $p < 0,05$ por prueba de t-Student, $n=10$ para el grupo AAV-R735X y $n=8$ para el grupo AAV-R735X-Ctag.

Discusión

Caracterización del mutante de *PKP2* R735X

La cardiomiopatía arritmogénica (ACM, del inglés “arrhythmogenic cardiomyopathy”) es una enfermedad familiar en la que la mayoría de los pacientes presentan una variante patogénica vinculada con componentes del desmosoma. La importancia de las mutaciones en los desmosomas, y la complejidad de los fenotipos asociados a esta patología, sugiere que la función de estos complejos multiprotéicos va más allá de ser elementos meramente estructurales que preservan la integridad de los cardiomiocitos durante los ciclos de contracción y relajación. Poco se conoce sobre el desarrollo de la enfermedad, y de cómo defectos en el desmosoma pueden afectar a procesos tan diversos como la contracción, la diferenciación celular o la propia electrofisiología de la célula cardíaca con una penetrancia tan variable. Dentro de los genes desmosomales, *PKP2* es el gen más comúnmente afectado en cohortes adultas y su importancia se justifica por su participación en múltiples funciones (Austin et al., 2019; Costa et al., 2020). La proteína *PKP2* forma parte de la estructura de los desmosomas, regula el ensamblaje de los mismos y contribuye a su fuerza mecánica, siendo un componente esencial en las células cardíacas (Moncayo-Arlandi et al., 2016). De hecho, una delección en homocigosis de *PKP2* en ratón, es letal en el embrión durante la gestación y resulta en una ruptura de la pared cardíaca, presumiblemente debida a defectos en la adhesión celular (Grossmann et al., 2004). Aunque la existencia de esta letalidad embrionaria enfatiza la importancia de *PKP2* como componente estructural de los desmosomas, no se emplea como modelo para la ACM. Los modelos de ratones haploinsuficientes para *PKP2* han sido los más utilizados, porque se consideran los más representativos en función de los hallazgos genéticos encontrados en pacientes de ACM, ya que en pacientes con mutaciones en heterocigosis, ha sido difícil demostrar la expresión de las proteínas mutantes. Esto es debido a que la mayoría de las mutaciones en *PKP2* descritas en pacientes de ACM, podrían ser susceptibles de generar proteínas inestables que se degraden rápidamente o incluso que no se traduzcan eficientemente (Austin et al., 2019; Kirchner Florian et al., 2012). La gran variabilidad en la penetrancia en la ACM, sugiere la existencia de múltiples mecanismos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, existen muy pocos modelos que involucren a formas truncadas de *PKP2* que generen síntomas diferentes a los que se producirían en casos de haploinsuficiencia, por lo que, a pesar de la importancia de las mutaciones truncadas de *PKP2* en la epidemiología de la ACM, se conoce poco sobre su patología y sus características moleculares (Cruz et al., 2015; Moncayo-Arlandi et al., 2016). En

concreto, la proteína mutante R735X se produce como consecuencia de la aparición de un codón de parada prematuro, que genera una proteína PKP2 truncada sin parte de la región C-terminal, y es capaz de provocar un fenotipo ACM. Para estudiar que procesos están afectados por este mutante de PKP2 se analizaron su estructura, estabilidad, localización y como afecta al interactoma. El análisis de la estructura mediante el desarrollo de un modelo tridimensional, reveló que la falta de parte del extremo C-terminal de la proteína, no permitía un plegamiento correcto del dominio N-terminal, alterando la topología y las propiedades electropotenciales globales en la superficie de la proteína. Este cambio conformacional en mutantes de PKP2, podría explicar diferencias en el interactoma, alteraciones en la localización y anomalías funcionales. El dominio N-terminal de PKP2, no presenta una estructura secundaria conocida, con la excepción de un tramo corto conservado en alfa-hélice cerca del extremo N-terminal, por lo tanto, se considera que se encuentra en gran parte desplegado (Hatzfeld et al., 2014). Nuestros análisis indican que la región C-terminal de PKP2 ejerce una acción estabilizadora sobre la proteína en su conjunto, permitiendo un correcto plegamiento del dominio N-terminal para establecer una conformación plegada. La estructura de la proteína de fusión R735X-Ctag, confirmaría este resultado, ya que al incorporar la proteína EGFP en la región C-terminal de la proteína R735X, el dominio N-terminal se plegaba más eficientemente, restaurando parcialmente su conformación.

Nuestros resultados demuestran que la proteína mutante R735X, se encontraba deslocalizada, mayoritariamente en el citoplasma celular *in vitro* e *in vivo*, en lugar de en el borde interno de la membrana plasmática o en los discos intercalares, donde se localiza la proteína PKP2 “wild-type”. Existen múltiples ejemplos de mutaciones patogénicas en el dominio de repeticiones armadillo de PKP2, que afectan a la región C-terminal de la proteína. Estas mutaciones tienen como consecuencia que dichas proteínas mutantes presenten una localización citoplasmática en lugar de localizarse en la cara interna de la membrana plasmática. Estos datos sugieren que la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la proteína, podría tener un papel importante en la localización de PKP2 en la membrana plasmática (Hall et al., 2009; Kirchner Florian et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados indican que al ocluir la región interna que queda expuesta en el mutante R735X, con un péptido no relacionado con PKP2, se rescata parcialmente la localización de la proteína y su función. Estos resultados sugieren que el dominio C-terminal de PKP2 carece de un motivo de secuencia específico requerido para la localización de la proteína en el desmosoma. Por tanto, esta perturbación se estaría produciendo a través de otros mecanismos que podrían ser directos, mediante la alteración del tráfico de la propia

proteína, o indirectos, a través de la pérdida, la aparición y/o la modificación de interacciones, que retendrían a la proteína en la fracción soluble.

Las interacciones conocidas de PKP2 se encuentran en el dominio N-terminal y aún no se han descrito interacciones que dependan de la región de repeticiones armadillo o del dominio C-terminal (Hatzfeld et al., 2014). Diferentes estudios demuestran que la pérdida del dominio N-terminal de la proteína o mutaciones en ciertos aminoácidos de dicho dominio, afectan a las interacciones de PKP2 con el resto de proteínas del desmosoma (Al-Jassar et al., 2013; Hall et al., 2009). Esto indica que las modificaciones estructurales que se producen en el dominio N-terminal del mutante R735X, modifican su plegamiento, alterando las afinidades relativas con otras proteínas ya que la proteína mutante R735X interactúa menos eficientemente con las proteínas del desmosoma y más eficientemente con proteínas del citoesqueleto como la MYH10, favoreciendo su deslocalización en la membrana y su retención en el citoplasma. Un estudio reciente en el que se desarrolló un modelo de ratón que expresaba la proteína truncada PKP2-Ser329, corrobora estos resultados y muestra que, al analizar el contenido de diferentes compartimentos subcelulares, la proteína PKP2 nativa se acumulaba mayoritariamente en la fracción de membrana, mientras que la proteína truncada de PKP2, se distribuía sobre todo en la fracción citoplasmática y en la del citoesqueleto (Moncayo-Arlandi et al., 2016). Además, nuestros resultados demuestran que la proteína R735X-Ctag, revierte parcialmente el efecto del mutante R735X sobre las interacciones con las proteínas del citoesqueleto, mejorando también su localización.

La proteína mutante R735X presentaba niveles detectables *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, sus niveles eran menores que los de la proteína PKP2 “*wild-type*” a igualdad de nivel de ARNm. Por tanto, esta diferencia no se debe a una alteración en los niveles de expresión, si no a diferencias en la traducción o en la estabilidad de la proteína, ocasionado por la alteración conformacional de la proteína y por una localización en un compartimento celular incorrecto. Es más probable que se deba a un problema en la estabilidad de la proteína, en base al comportamiento de la proteína de fusión R735X-Ctag, en la que al mejorar su conformación, presentaba niveles de proteína superiores a los de la proteína mutante R735X, indicando una mayor estabilidad proteica. El hecho de que la proteína mutante R735X pueda ser sometida a una degradación más eficiente, se apoya en otros estudios que muestran que mutaciones patogénicas similares a la mutación R735X, como C796R, C693fsX741, S615F y K654Q, presentan una inestabilidad intrínseca. En estos modelos *in vitro*, estos mutantes sufren una degradación específica mediada por calpaínas (Kirchner Florian et al., 2012). También existen datos de pacientes que sugieren que los portadores de mutaciones patogénicas en el gen *PKP2*, tienen expresión reducida de

proteína PKP2 en el miocardio. En la mayoría de estos casos, ha sido imposible detectar niveles de las proteínas truncadas, bien por problemas técnicos o por su completa degradación. Esto ha llevado a asumir, que la mayoría de las mutaciones de *PKP2*, generan mutantes inestables y que un mecanismo de haploinsuficiencia sea el mayor determinante en el desarrollo de la ACM. Sin embargo, los niveles de la proteína PKP2, solamente han sido investigado en un número limitado de pacientes genotipados a día de hoy, debido a la dificultad de obtener cantidades suficientes de tejido miocárdico (Gerull et al., 2004; Rasmussen et al., 2014). Según nuestros resultados, la expresión de la mutación R735X, no produce un efecto de haploinsuficiencia y además, previamente se había demostrado que la proteína truncada R735X, actuaba como un mutante dominante negativo (Cruz et al., 2015). Se han descrito otras mutaciones de *PKP2* que pueden actuar a través de un efecto dominante negativo, hipotetizando que interrumpían el funcionamiento normal de la proteína PKP2 nativa (Alcalde et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados indicaron que el mutante R735X, no afectaba ni a los niveles, ni a la localización de la proteína PKP2 “*wild-type*”, sugiriendo que este tipo de mutantes no se comportan estrictamente como dominantes negativos, sino como mutantes con ganancia de función. Sirvan como ejemplo otras mutaciones patogénicas en *PKP2*, como R79X y 179fs, que tampoco afectaban a la localización de la proteína PKP2 endógena (Joshi-Mukherjee et al., 2008).

Fenotipo estructural de la cardiomiopatía arritmogénica

La imagen cardiaca por resonancia magnética (MRI) se ha convertido en una herramienta básica para el diagnóstico de la ACM durante la última década. Esta metodología permite detectar cambios estructurales de manera precisa y valorar la disfunción ventricular, incluso en etapas tempranas de la enfermedad (Towbin et al., 2019). Los estudios por MRI, muestran que la expresión del mutante R735X, provoca una reducción de la fracción de eyección del ventrículo derecho (FE-VD) y un aumento del volumen sistólico final del ventrículo derecho (VSF-VD), afectando por tanto, a la capacidad de contracción de los ventrículos, principalmente al ventrículo derecho. Por el contrario, ninguno de estos efectos se manifestó en animales en los que se silenció la expresión de *PKP2*, demostrando que la presencia de la proteína mutante R735X, es el desencadenante del fenotipo que está asociada a esta disfunción cardiaca, y no la disminución de la cantidad de proteína de PKP2.

La progresión de la ACM se ha asociado históricamente con alteraciones estructurales ligadas a un reemplazo progresivo de cardiomiocitos ventriculares por grasa y tejido fibrótico (Costa et al., 2020). Sin embargo, existen diferentes modelos animales y series de pacientes, donde no

se requiere una sustitución del tejido cardíaco por tejido fibroadiposo, para padecer una disfunción ventricular (Cerrone et al., 2012; Cruz et al., 2015; Gerull & Brodehl, 2020; Moncayo-Arlandi et al., 2016). Nuestros resultados demuestran que el reemplazo fibroadiposo no es necesario para desencadenar un fenotipo estructural de ACM, y por tanto, el deterioro de la función ventricular viene determinado por un mecanismo totalmente independiente, como es la desregulación del citoesqueleto de actomiosina, abriendo un nuevo campo de investigación y tratamiento.

Efecto de la proteína R735X sobre el citoesqueleto de actomiosina

Demostramos que PKP2 tiene una actividad independiente de su función estructural en el desmosoma, interviniendo en la regulación de la organización del citoesqueleto de actomiosina. Una interacción óptima entre PKP2 y MYH10 permite una correcta distribución y preservación de la estructura de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina, así como el mantenimiento de las propiedades biomecánicas de los filamentos de actina y la arquitectura celular (Fig. 36).

Los resultados muestran que PKP2 interacciona con proteínas del citoesqueleto como MYH9, MYH10 y actina. Estas interacciones probablemente no se producen a través de la región C-terminal, ya que el mutante R735X es capaz de interactuar con estas mismas proteínas. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que se traten de interacciones indirectas y que impliquen a otras proteínas. La proteína mutante R735X disminuye las interacciones con el resto de proteínas que forman parte del desmosoma, y por el contrario, las incrementa con las proteínas del citoesqueleto MYH10 y actina citoplasmática (ACTB). Por tanto, esta alteración en las interacciones con la MYH10 y con la actina citoplasmática, podría ser la responsable de la modificación espacial en la distribución de dichas proteínas a nivel de membrana. Por otra parte, si asumimos que el efecto de la proteína mutante R735X sobre la desorganización de las proteínas del citoesqueleto, es específico y se basa en una ganancia de función anormal, el silenciamiento de la expresión de *PKP2* (shPKP2) no debería generar un fenotipo estructural. Según nuestros resultados, este sería el caso, ya que el silenciamiento del 80% de la expresión de *PKP2*, solamente altera la distribución de la actina a nivel de membrana, de acuerdo con estudios anteriores (Godsel et al., 2010), mientras que la organización de la MYH9 y la MYH10 no se modifica. En conjunto, estos datos demuestran que la localización en el citoplasma de la proteína mutante R735X, y no el nivel de proteína de PKP2, provoca alteraciones en la distribución de las proteínas del citoesqueleto de actomiosina.

Las funciones coordinadas de MYH9 y MYH10 y su correcta distribución, son esenciales para el ensamblaje apropiado de los filamentos de actina y del sarcómero en los cardiomiocitos (Fenix et al., 2018). Nuestros resultados revelaron que la presencia del mutante R735X, alteraba la estructura que conforma el citoesqueleto de MYH9 y de MYH10 y su distribución relativa *in vitro* e *in vivo*. Las moléculas de NMII se organizan entre sí en filamentos bipolares paralelos a un haz de actina, generando estructuras similares a los sarcómeros musculares (Brito & Sousa, 2020; Hu et al., 2017). Estas estructuras son importantes en los cardiomiocitos por varios motivos. En primer lugar, se cree que los cardiomiocitos inician su ensamblaje a partir de este tipo de estructuras llamadas "estructuras similares a fibras de tensión", de apariencia similar a las fibras de tensión clásicas (Dabiri et al., 1997; Fenix et al., 2018; Sanger et al., 2006). Por otra parte, sirven como enlace de los sarcómeros a los discos intercalares y a los costámeros, proporcionándoles integridad estructural y capacidad de detección de la tensión normal de los cardiomiocitos. De esta manera, se han observado que alteraciones en la distribución de las NMII en corazones de pacientes con patologías cardíacas, y su acumulación en lugares inadecuados, contribuye a la detección de tensión aberrante y al remodelado cardíaco (Grimes et al., 2019).

El mutante R735X también altera la estructura del citoesqueleto de actina, disminuyendo la cantidad de filamentos ensamblados por encima del núcleo y modificando las propiedades biomecánicas de dichos filamentos, ocasionando un cambio en la arquitectura celular y un desequilibrio en el balance F-actina: G-actina, como reflejo de la desorganización del citoesqueleto. Se ha llegado a sugerir, que la presencia de la β -actina asociada a los discos Z y a los costámeros, y su dinámica de polimerización/despolimerización, pueden ser importantes para la función de contracción en cardiomiocitos adultos (Balasubramanian et al., 2010). La presencia del mutante R735X, también modifica la orientación relativa de los sarcómeros en cardiomiocitos adultos. Desde una perspectiva biofísica, la naturaleza vectorial de la fuerza predice que, un aumento en la desviación del ángulo del eje perpendicular del sarcómero, produciría una reducción en la magnitud final de la fuerza generada. Por lo tanto, una alineación incorrecta de los cardiomiocitos que expresan el mutante R735X, podrían justificar una disminución en la fuerza que el músculo cardíaco puede ejercer. Hay estudios que describen que una variación en la orientación del sarcómero debida a la inclinación, torsión y desviaciones del eje de las miofibrillas dentro de las fibras musculares, pueden explicar una caída de la fuerza durante la actividad contráctil (Friedrich et al., 2010). Por tanto, sarcómeros con una microarquitectura más irregular, como en el caso de los ratones que expresaban el mutante R735X, impedirían una contracción coordinada y alineada, comprometiendo la capacidad de

generar una fuerza óptima por parte del tejido cardíaco. Adicionalmente, no se han observado diferencias en la variación de la orientación de los sarcómeros cuando se silencia la expresión de *PKP2*, mientras que la expresión de la proteína de fusión R735X-Ctag, revierte parcialmente este fenotipo. A la vista de los resultados, variaciones en la organización del sarcómero que afecte a su microarquitectura, debidas a la presencia del mutante R735X, podrían ser las causantes de la disminución de la capacidad de contracción del músculo cardíaco observada en el análisis por MRI. Por tanto, solamente la presencia de la proteína mutante R735X y su localización citoplasmática, provoca la aparición del fenotipo estructural que afecta al citoesqueleto de actomiosina, indicando que el mutante R735X actúa como un mutante con ganancia de función.

Nuestros resultados indican que el mutante R735X afectaría tanto a la distribución como a la función de la MYH10. Están descritos numerosos mecanismos de regulación de la actividad y de la localización subcelular de la MYH9 y MYH10. La activación e inactivación se regula principalmente a través de fosforilaciones y desfosforilaciones de las cadenas ligeras reguladoras (CLR). El equilibrio entre la actividad de la miosina quinasa y la fosfatasa, determina la extensión y la complejidad de los filamentos de miosina que se van a formar, en el lugar correcto y en el momento adecuado. Esto es esencial para una correcta función de la MYH9 y MYH10 en las células. Sin embargo, pueden producirse otro tipo de regulaciones modificando las colas de las cadenas pesadas (CPNMII). Los eventos que se producen en esta zona, como fosforilaciones, interacciones con otras proteínas y la co-polimerización en filamentos bipolares, son importantes para controlar el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de MYH9 y MY10 y por tanto, para la formación de haces de actomiosina. Las fosforilaciones en la cola producen un desplazamiento del equilibrio monómero-filamento hacia el monómero y las interacciones con otras proteínas pueden conllevar al desensamblaje de los filamentos de miosinas (Betapudi, 2014; Brito & Sousa, 2020; Sellers & Heissler, 2019). Por ejemplo, fosforilaciones mediadas por PKC en las CLR, son inhibitorias ya que están asociadas a la disminución de la tasa de hidrólisis de ATP y desensamblaje de las fibras de actina. Además estas fosforilaciones reducen alostéricamente la fosforilación de la Ser19 inducida por MLCK, disminuyendo así la actividad ATPasa de la MYH9 y la MYH10. PKC, entre otras kinasas, también fosforila el dominio de la cola, lo que promueve el desmontaje y la despolimerización de los filamentos bipolares de MYH9 y MYH10 (Brito & Sousa, 2020). PKC puede regular la actividad de las miosinas bajo condiciones fisiológicas normales, pero también se ha descrito que, bajo ciertas condiciones patológicas, se induce la activación de PKC, incrementando la fosforilación de las NMII (Betapudi, 2014; Newell-Litwa et al., 2015). En este contexto, nuestros resultados

apoyan la hipótesis de que el aumento en la interacción entre el mutante R735X y la MYH10, podría deberse a que el mutante R735X atrapa a la MYH10, provocando su deslocalización subcelular y su inactivación. Esto conllevaría a una conformación deficiente del citoesqueleto de la MYH9 y de la propia MYH10 y, por consiguiente, afectaría al citoesqueleto de actina. Además, al expresar la proteína de fusión R735X-Ctag, disminuía la interacción de esta proteína con la MYH10, y mejoraba la estructura del citoesqueleto de MYH9 y MYH10, así como la conformación del citoesqueleto de actina. Este efecto de la MYH10 sobre el citoesqueleto de actina, se demostró al emplear activadores específicos de dicha miosina, Kif26b y 4-Hidroxiacetofenona (4-HAP) en células HL-1 que expresaban de forma estable el mutante R735X, las cuales incrementaban el ensamblaje y la organización del citoesqueleto de MYH10. Esto se traducía en una mejora de la organización del citoesqueleto de MYH9, así como de la estructura del citoesqueleto de actina y la arquitectura celular. Kif26b es un miembro de la familia de las kinesinas que interacciona específicamente con la MYH10 y su sobreexpresión conlleva una activación de las MYH10 y MYH14, incrementando su interacción con los filamentos de actina (Guillabert-Gourgues et al., 2016; Uchiyama et al., 2010). Además, el tratamiento con la molécula 4-HAP promueve la regulación del citoesqueleto de actomiosina, alterando la organización y la tensión de los filamentos de actina, a través de la activación y el ensamblaje de la MYH10 (Bryan et al., 2020; Surcel et al., 2015).

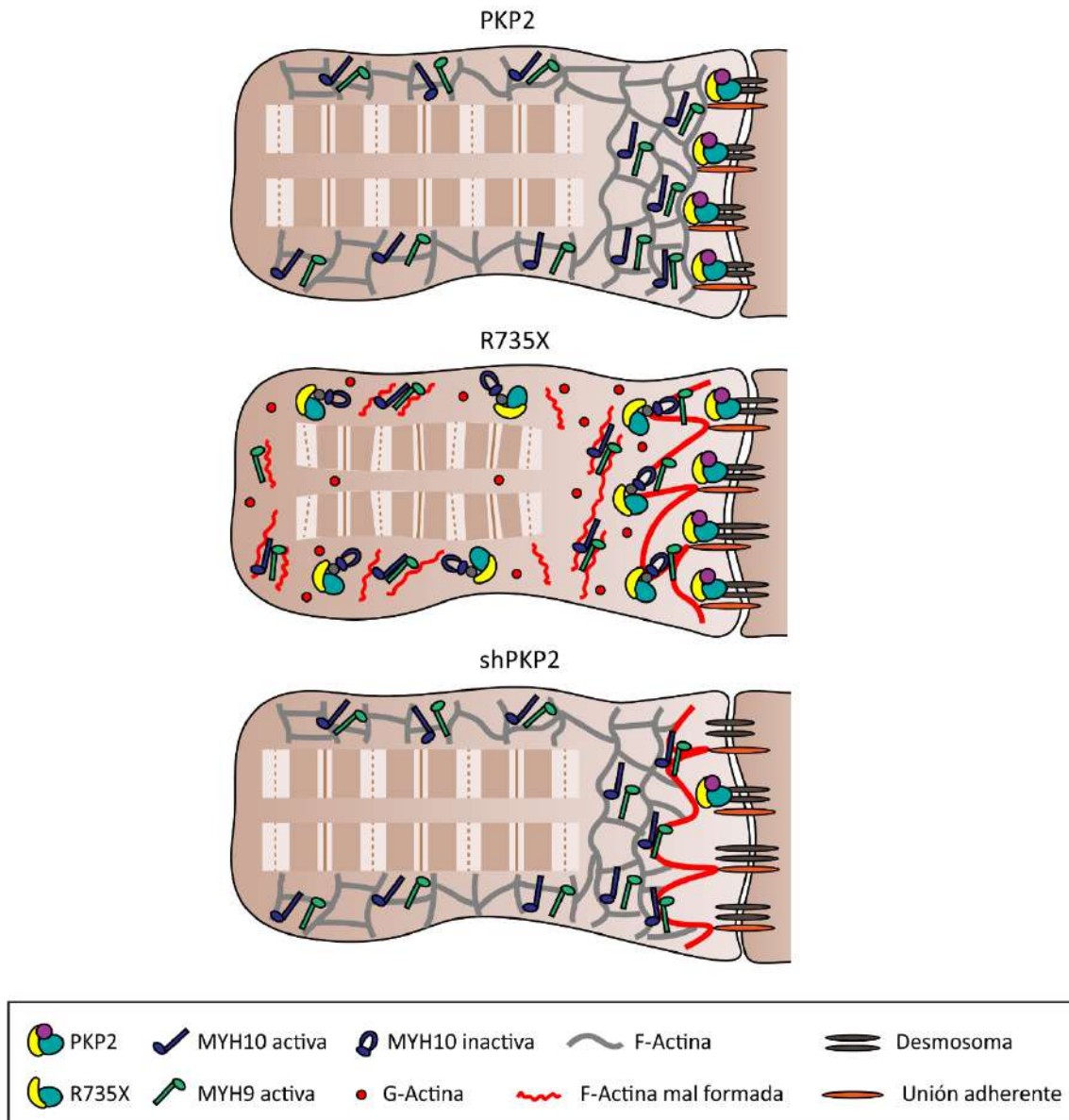


Figura 36. Diagrama de los modelos de expresión del mutante R735X y *shPKP2*. En el modelo “*wild-type*”, PKP2 se localiza en los desmosomas y los cardiomiocitos presentan una estructura del citoesqueleto de actomiosina y una orientación sarcomérico normal. En el modelo de expresión del mutante R735X, la proteína truncada R735X se deslocaliza en el citoplasma, e interacciona de forma aberrante con la MYH10, provocando una alteración en la estructura del citoesqueleto de actomiosina y en la disposición de los sarcómeros. En el modelo de silenciamiento de la expresión de *PKP2*, solo la actina a nivel de membrana se encuentra alterada y tanto la estructura del citoesqueleto de actomiosina, como la orientación de los sarcómeros son normales.

Terapia génica

La ACM es una enfermedad para la que actualmente no existe tratamiento. Su compleja patogénesis, crea muchas oportunidades para la investigación de posibles terapias para prevenir o revertir la enfermedad. Nuestro trabajo muestra la regulación del citoesqueleto de actomiosina, como una diana terapéutica en el control de la patología de la ACM. Adicionalmente, conocer el mecanismo de acción de la mutación de PKP2, debe determinar la estrategia de una potencial terapia. Dentro de estas estrategias, las mutaciones que causan haploinsuficiencia, requerirían de terapias génicas de suplementación con el gen PKP2 “*wild-type*” para restaurar la función. En el caso de la mutación R735X, nuestros resultados indican que se trata de una mutación que actúa por ganancia de función y su presencia en la célula, incluso a niveles muy bajos, es capaz de producir modificaciones estructurales que son nocivas para las células. La estrategia terapéutica requeriría un enfoque basado en una supresión inicial del alelo mutante, seguida de una complementación con PKP2 “*wild-type*”.

De cara a la búsqueda de terapias alternativas, sería interesante realizar una investigación de moléculas o péptidos capaces de unirse a la proteína mutante R735X mediante autoacoplamiento, para ocluir de forma óptima la región interna que queda expuesta en la proteína mutante R735X y recuperar su conformación. Nuestros resultados con la proteína de fusión R735X-Ctag, indican que este tipo de aproximación es posible.

Por otra parte, hemos identificado a la MYH9 y a la MYH10 como proteínas que interaccionan específicamente con PKP2. Adicionalmente, nuestros datos *in vitro* demuestran que la sobreactivación de la actividad de la MYH10, rescata el efecto del mutante R735X sobre el citoesqueleto de actomiosina. Se conoce que la ausencia o la reducción de la actividad de la MYH10 puede producir efectos letales en el corazón (Betapudi, 2014; Sellers & Heissler, 2019). Esto sugiere que la activación de proteínas específicas podría emplearse como potencial tratamiento futuro para la ACM. No obstante, es posible que existan muchas otras proteínas potenciales, además de las miosinas, cuya interacción puede contribuir a la desregulación del sarcómero en el contexto de la enfermedad humana. Por lo tanto, comprender los eventos que ocurren a escala molecular y celular, puede mejorar nuestro conocimiento del funcionamiento del corazón, así como abrir nuevas rutas para generar herramientas de diagnóstico y terapias más específicas.

Conclusiones

1. La región C-terminal de PKP2 es necesaria para estabilizar el dominio N-terminal y la estructura general de la proteína. El cambio estructural provocado por la delección de parte de la región C-terminal en el mutante R735X, modifica la localización y la función de la proteína truncada.
2. La presencia de la proteína mutante R735X, no afecta ni a los niveles totales ni a la localización de la proteína PKP2 “*wild-type*”, lo que sugiere que el mutante R735X no interfiere en la función de PKP2.
3. PKP2 interacciona con proteínas del citoesqueleto de actomiosina, y el mutante R735X interacciona diferencialmente con la MYH10.
4. El mutante R735X compromete la organización del citoesqueleto de actomiosina *in vitro* e *in vivo*.
5. La presencia del mutante R735X, altera las propiedades biomecánicas del citoesqueleto de actina, afectando a la elasticidad y a la tensión de los filamentos de actina *in vitro* y a la función cardíaca *in vivo*.
6. El mutante R735X induce defectos en la organización del citoesqueleto de actomiosina a través de la alteración de la función de la MYH10, por lo que actúa como un mutante con ganancia de función.
7. Reducir la cantidad de PKP2 usando un *shRNA* (equivalente a un fenotipo de haploinsuficiencia), no afecta a la regulación del citoesqueleto de actomiosina.
8. La oclusión estérica de la región interna de PKP2 expuesta en la proteína mutante R735X, puede ser una nueva diana terapéutica en la ACM.

Bibliografía

Bibliografía

- Ahmed, S. T., Craven, L., Russell, O. M., Turnbull, D. M., & Vincent, A. E. (2018). Diagnosis and Treatment of Mitochondrial Myopathies. *Neurotherapeutics*, *15*(4), 943-953. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00674-4>
- Alcalde, M., Campuzano, O., Berne, P., García-Pavía, P., Doltra, A., Arbelo, E., Sarquella-Brugada, G., Iglesias, A., Alonso-Pulpon, L., Brugada, J., & Brugada, R. (2014). Stop-Gain Mutations in PKP2 Are Associated with a Later Age of Onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *PLOS ONE*, *9*(6), e100560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100560>
- Alcalde, M., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Arbelo, E., Allegue, C., Partemi, S., Iglesias, A., Oliva, A., Brugada, J., & Brugada, R. (2015). Clinical interpretation of genetic variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology*, *104*(4), 288-303. <https://doi.org/10.1007/s00392-014-0794-z>
- Al-Jassar, C., Bikker, H., Overduin, M., & Chidgey, M. (2013). Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases. *Journal of Molecular Biology*, *425*(21), 4006-4022. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.035>
- Austin, K. M., Trembley, M. A., Chandler, S. F., Sanders, S. P., Saffitz, J. E., Abrams, D. J., & Pu, W. T. (2019). Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(9), 519-537. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0200-7>
- Awad, M. M., Calkins, H., & Judge, D. P. (2008). Mechanisms of Disease: Molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *5*(5), 258-267. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio1182>
- Azaouagh, A., Churzidse, S., Konorza, T., & Erbel, R. (2011). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: A review and update. *Clinical Research in Cardiology*, *100*(5), 383-394. <https://doi.org/10.1007/s00392-011-0295-2>
- Balasubramanian, S., Mani, S. K., Kasiganesan, H., Baicu, C. C., & Kuppaswamy, D. (2010). Hypertrophic Stimulation Increases β -actin Dynamics in Adult Feline Cardiomyocytes. *PLoS ONE*, *5*(7), e11470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011470>
- Bao, J., Wang, J., Yao, Y., Wang, Y., Fan, X., Sun, K., He, D. S., Marcus, F. I., Zhang, S., Hui, R., & Song, L. (2013). Correlation of ventricular arrhythmias with genotype in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, *6*(6), 552-556. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000122>

- Basso, C., Bauce, B., Corrado, D., & Thiene, G. (2012). Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(4), 223-233. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.173>
- Bass-Zubek, A. E., Hobbs, R. P., Amargo, E. V., Garcia, N. J., Hsieh, S. N., Chen, X., Wahl, J. K., Denning, M. F., & Green, K. J. (2008). Plakophilin 2: A critical scaffold for PKC α that regulates intercellular junction assembly. *Journal of Cell Biology*, 181(4), 605-613. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712133>
- Beckmann, B.-M., Pfeufer, A., & Kääb, S. (2011). Inherited Cardiac Arrhythmias. *Deutsches Arzteblatt Online*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0623>
- Bennett, R. G., Haqqani, H. M., Berruezo, A., Della Bella, P., Marchlinski, F. E., Hsu, C.-J., & Kumar, S. (2019). Arrhythmogenic Cardiomyopathy in 2018–2019: ARVC/ALVC or Both? *Heart, Lung and Circulation*, 28(1), 164-177. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.10.013>
- Betapudi, V. (2014). Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. *Frontiers in Chemistry*, 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00045>
- Brieler, J., Breeden, M. A., & Tucker, J. (2017). Cardiomyopathy: An Overview. *American Family Physician*, 96(10), 640-646.
- Brito, C., & Sousa, S. (2020). Non-Muscle Myosin 2A (NM2A): Structure, Regulation and Function. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071590>
- Bryan, D. S., Stack, M., Krysztofiak, K., Cichoń, U., Thomas, D. G., Surcel, A., Schiffhauer, E. S., Beckett, M. A., Khodarev, N. N., Xue, L., Poli, E. C., Pearson, A. T., Posner, M. C., Robinson, D. N., Rock, R. S., & Weichselbaum, R. R. (2020). 4-Hydroxyacetophenone modulates the actomyosin cytoskeleton to reduce metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(36), 22423-22429. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014639117>
- Cerrone, M., Montnach, J., Lin, X., Zhao, Y.-T., Zhang, M., Agullo-Pascual, E., Leo-Macias, A., Alvarado, F. J., Dolgalev, I., Karathanos, T. V., Malkani, K., Van Opbergen, C. J. M., van Bavel, J. J. A., Yang, H.-Q., Vasquez, C., Tester, D., Fowler, S., Liang, F., Rothenberg, E., ... Delmar, M. (2017). Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm. *Nature Communications*, 8(1), 106. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00127-0>
- Cerrone, M., Noorman, M., Lin, X., Chkourko, H., Liang, F.-X., van der Nagel, R., Hund, T., Birchmeier, W., Mohler, P., van Veen, T. A., van Rijen, H. V., & Delmar, M. (2012). Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovascular Research*, 95(4), 460-468. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs218>

- Chen, S. N., Gurha, P., Lombardi, R., Ruggiero, A., Willerson, J. T., & Marian, A. J. (2014). The Hippo Pathway Is Activated and Is a Causal Mechanism for Adipogenesis in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, *114*(3), 454-468. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302810>
- Corrado, D. (2019). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Evaluation of the current diagnostic criteria and differential diagnosis OUP accepted manuscript. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz669>
- Corrado, D., Perazzolo Marra, M., Zorzi, A., Beffagna, G., Cipriani, A., Lazzari, M. D., Migliore, F., Pilichou, K., Rampazzo, A., Rigato, I., Rizzo, S., Thiene, G., Anastasakis, A., Asimaki, A., Bucciarelli-Ducci, C., Haugaa, K. H., Marchlinski, F. E., Mazzanti, A., McKenna, W. J., ... Basso, C. (2020). Diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: The Padua criteria. *International Journal of Cardiology*, S0167527320332939. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.06.005>
- Corrado Domenico, Basso Cristina, & Judge Daniel P. (2017). Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, *121*(7), 784-802. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309345>
- Costa, S., Cerrone, M., Saguner, A. M., Brunckhorst, C., Delmar, M., & Duru, F. (2020). Arrhythmogenic cardiomyopathy: An in-depth look at molecular mechanisms and clinical correlates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, S1050173820301031. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2020.07.006>
- Cruz, F. M., Sanz-Rosa, D., Roche-Molina, M., García-Prieto, J., García-Ruiz, J. M., Pizarro, G., Jiménez-Borreguero, L. J., Torres, M., Bernad, A., Ruíz-Cabello, J., Fuster, V., Ibáñez, B., & Bernal, J. A. (2015). Exercise triggers ARVC phenotype in mice expressing a disease-causing mutated version of human plakophilin-2. *Journal of the American College of Cardiology*, *65*(14), 1438-1450. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.01.045>
- Dabiri, G. A., Turnacioglu, K. K., Sanger, J. M., & Sanger, J. W. (1997). Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(17), 9493-9498. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9493>
- Delmar, M., & McKenna, W. J. (2010). The Cardiac Desmosome and Arrhythmogenic Cardiomyopathies: From Gene to Disease. *Circulation Research*, *107*(6), 700-714. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223412>
- Dwyer, J., Iskratsch, T., & Ehler, E. (2012). Actin in striated muscle: Recent insights into assembly and maintenance. *Biophysical Reviews*, *4*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1007/s12551-011-0062-7>

- Elias Neto, J., Tonet, J., Frank, R., & Fontaine, G. (2018). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D)—What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. <https://doi.org/10.5935/abc.20180266>
- Fenix, A. M., & Burnette, D. T. (2018). Assembly of myosin II filament arrays: Network Contraction versus Expansion. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, *75*(12), 545-549. <https://doi.org/10.1002/cm.21487>
- Fenix, A. M., Neininger, A. C., Taneja, N., Hyde, K., Visetsouk, M. R., Garde, R. J., Liu, B., Nixon, B. R., Manalo, A. E., Becker, J. R., Crawley, S. W., Bader, D. M., Tyska, M. J., Liu, Q., Gutzman, J. H., & Burnette, D. T. (2018). Muscle-specific stress fibers give rise to sarcomeres in cardiomyocytes. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.42144>
- Fontaine, G., Fontaliran, F., Frank, R., Lascault, G., Tonet, J., Tchoubrieva, J., Rosas, F., & Grosogeat, Y. (1993). [Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. A new clinical entity]. *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine*, *177*(3), 501-512; discussion 512-514.
- Friedrich, O., Both, M., Weber, C., Schürmann, S., Teichmann, M. D. H., von Wegner, F., Fink, R. H. A., Vogel, M., Chamberlain, J. S., & Garbe, C. (2010). Microarchitecture Is Severely Compromised but Motor Protein Function Is Preserved in Dystrophic mdx Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, *98*(4), 606-616. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.005>
- Gallo, P., d'Amati, G., & Pelliccia, F. (1992). Pathologic evidence of extensive left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Human Pathology*, *23*(8), 948-952. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90410-5](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90410-5)
- Gandjbakhch, E., Redheuil, A., Pousset, F., Charron, P., & Frank, R. (2018). Clinical Diagnosis, Imaging, and Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, *72*(7), 784-804. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.065>
- Garcia-Gras, E. (2006). Suppression of canonical Wnt/ -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 2012-2021. <https://doi.org/10.1172/JCI27751>
- Gerull, B., & Brodehl, A. (2020). Genetic Animal Models for Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*, *11*, 624. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00624>
- Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C. T., McDermott, D. A., Lerman, B. B., Markowitz, S. M., Ellinor, P. T., MacRae, C. A., Peters, S., Grossmann, K. S., Michely, B., Sasse-Klaassen, S., Birchmeier, W., Dietz, R., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., & Thierfelder, L. (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common

- in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nature Genetics*, 36(11), 1162.
<https://doi.org/10.1038/ng1461>
- Godsel, L. M., Dubash, A. D., Bass-Zubek, A. E., Amargo, E. V., Klessner, J. L., Hobbs, R. P., Chen, X., & Green, K. J. (2010). Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, 21(16), 2844-2859.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E10-02-0131>
- Godsel, L. M., Hsieh, S. N., Amargo, E. V., Bass, A. E., Pascoe-McGillicuddy, L. T., Huen, A. C., Thorne, M. E., Gaudry, C. A., Park, J. K., Myung, K., Goldman, R. D., Chew, T.-L., & Green, K. J. (2005). Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions. *Journal of Cell Biology*, 171(6), 1045-1059. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510038>
- Gray, B., & Behr, E. R. (2016). New Insights Into the Genetic Basis of Inherited Arrhythmia Syndromes. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 9(6), 569-577.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001571>
- Green, K. J., Jaiganesh, A., & Broussard, J. A. (2019). Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Research*, 8, 2150.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.20942.1>
- Grimes, K. M., Prasad, V., & McNamara, J. W. (2019). Supporting the heart: Functions of the cardiomyocyte's non-sarcomeric cytoskeleton. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 131, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.04.002>
- Groeneweg, J. A., Bhonsale, A., James, C. A., te Riele, A. S., Dooijes, D., Tichnell, C., Murray, B., Wiesfeld, A. C. P., Sawant, A. C., Kassamali, B., Atsma, D. E., Volders, P. G., de Groot, N. M., de Boer, K., Zimmerman, S. L., Kamel, I. R., van der Heijden, J. F., Russell, S. D., Jan Cramer, M., ... Calkins, H. (2015). Clinical Presentation, Long-Term Follow-Up, and Outcomes of 1001 Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Patients and Family Members. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 8(3), 437-446.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.001003>
- Grossmann, K. S., Grund, C., Huelsken, J., Behrend, M., Erdmann, B., Franke, W. W., & Birchmeier, W. (2004). Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *The Journal of Cell Biology*, 167(1), 149-160.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200402096>
- Guillabert-Gourgues, A., Jaspard-Vinassa, B., Bats, M.-L., Sewduth, R. N., Franzl, N., Peghaire, C., Jeanningros, S., Moreau, C., Roux, E., Larrieu-Lahargue, F., Dufourcq, P., Couffinal, T., & Duplàa, C. (2016). Kif26b controls endothelial cell polarity through the Dishevelled/Daam1-dependent planar cell polarity–signaling pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 27(6), 941-953. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-08-1332>

- Guo, J., Wang, Y., Sachs, F., & Meng, F. (2014). Actin stress in cell reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(49), E5252-5261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411683111>
- Hall, C., Li, S., Li, H., Creason, V., & Wahl, J. K. (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy plakophilin-2 mutations disrupt desmosome assembly and stability. *Cell Communication & Adhesion*, *16*(1-3), 15-27. <https://doi.org/10.1080/15419060903009329>
- Hatzfeld, M., Wolf, A., & Keil, R. (2014). Plakophilins in Desmosomal Adhesion and Signaling. *Cell Communication & Adhesion*, *21*(1), 25-42. <https://doi.org/10.3109/15419061.2013.876017>
- Haugaa, K. H., Haland, T. F., Leren, I. S., Saberniak, J., & Edvardsen, T. (2016). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, clinical manifestations, and diagnosis. *Europace*, *18*(7), 965-972. <https://doi.org/10.1093/europace/euv340>
- Hu, S., Dasbiswas, K., Guo, Z., Tee, Y.-H., Thiagarajan, V., Hersen, P., Chew, T.-L., Safran, S. A., Zaidel-Bar, R., & Bershadsky, A. D. (2017). Long-range self-organization of cytoskeletal myosin II filament stacks. *Nature Cell Biology*, *19*(2), 133-141. <https://doi.org/10.1038/ncb3466>
- Joshi-Mukherjee, R., Coombs, W., Musa, H., Oxford, E., Taffet, S., & Delmar, M. (2008). Characterization of the molecular phenotype of two arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)-related plakophilin-2 (PKP2) mutations. *Heart Rhythm*, *5*(12), 1715-1723. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2008.09.009>
- Kirchner Florian, Schuetz Anja, Boldt Leif-Hendrik, Martens Kristina, Dittmar Gunnar, Haverkamp Wilhelm, Thierfelder Ludwig, Heinemann Udo, & Gerull Brenda. (2012). Molecular Insights into Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Plakophilin-2 Missense Mutations. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *5*(4), 400-411. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.961854>
- Koenderink, G. H., & Paluch, E. K. (2018). Architecture shapes contractility in actomyosin networks. *Current Opinion in Cell Biology*, *50*, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.015>
- Lee, S. R., & Han, J. (2017). Mitochondrial Mutations in Cardiac Disorders. En G. Santulli (Ed.), *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine* (Vol. 982, pp. 81-111). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_5
- Leo-Macías, A., Liang, F.-X., & Delmar, M. (2015). Ultrastructure of the intercellular space in adult murine ventricle revealed by quantitative tomographic electron microscopy. *Cardiovascular Research*, *107*(4), 442-452. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv182>

- Lombardi, R., & Marian, A. J. (2011). Molecular Genetics and Pathogenesis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: A Disease of Cardiac Stem Cells. *Pediatric Cardiology*, 32(3), 360-365. <https://doi.org/10.1007/s00246-011-9890-2>
- Masarone, D., Kaski, J. P., Pacileo, G., Elliott, P. M., Bossone, E., Day, S. M., & Limongelli, G. (2018). Epidemiology and Clinical Aspects of Genetic Cardiomyopathies. *Heart Failure Clinics*, 14(2), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2017.12.007>
- McKenna, W. J., Thiene, G., Nava, A., Fontaliran, F., Blomstrom-Lundqvist, C., Fontaine, G., & Camerini, F. (1994). Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Heart*, 71(3), 215-218. <https://doi.org/10.1136/hrt.71.3.215>
- McKenna, William J., Maron, B. J., & Thiene, G. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research*, 121(7), 722-730. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>
- Michalodimitrakis, M., Papadomanolakis, A., Stiakakis, J., & Kanaki, K. (2002). Left Side Right Ventricular Cardiomyopathy. *Medicine, Science and the Law*, 42(4), 313-317. <https://doi.org/10.1177/002580240204200406>
- Moncayo-Arlandi, J., Guasch, E., Sanz-de la Garza, M., Casado, M., Garcia, N. A., Mont, L., Sitges, M., Knöll, R., Buyandelger, B., Campuzano, O., Diez-Juan, A., & Brugada, R. (2016). Molecular disturbance underlies to arrhythmogenic cardiomyopathy induced by transgene content, age and exercise in a truncated PKP2 mouse model. *Human Molecular Genetics*, 25(17), 3676-3688. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw213>
- Newell-Litwa, K. A., Horwitz, R., & Lamers, M. L. (2015). Non-muscle myosin II in disease: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Disease Models & Mechanisms*, 8(12), 1495-1515. <https://doi.org/10.1242/dmm.022103>
- Nishimura, R. A., Seggewiss, H., & Schaff, H. V. (2017). Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy: Surgical Myectomy and Septal Ablation. *Circulation Research*, 121(7), 771-783. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309348>
- Noorman, M., Hakim, S., Kessler, E., Groeneweg, J. A., Cox, M. G. P. J., Asimaki, A., van Rijen, H. V. M., van Stuijvenberg, L., Chkourko, H., van der Heyden, M. A. G., Vos, M. A., de Jonge, N., van der Smagt, J. J., Dooijes, D., Vink, A., de Weger, R. A., Varro, A., de Bakker, J. M. T., Saffitz, J. E., ... van Veen, T. A. B. (2013). Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic

- cardiomyopathy. *Heart Rhythm*, 10(3), 412-419.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2012.11.018>
- Novelli, V., Malkani, K., & Cerrone, M. (2018). Pleiotropic Phenotypes Associated With PKP2 Variants. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 184.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00184>
- Ohno, S., Nagaoka, I., Fukuyama, M., Kimura, H., Itoh, H., Makiyama, T., Shimizu, A., & Horie, M. (2013). Age-dependent clinical and genetic characteristics in Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 77(6), 1534-1542.
<https://doi.org/10.1253/circj.cj-12-1446>
- Patel, V., Asatryan, B., Siripanthong, B., Munroe, P. B., Tiku-Owens, A., Lopes, L. R., Khanji, M. Y., Protonotarios, A., Santangeli, P., Muser, D., Marchlinski, F. E., Brady, P. A., & Chahal, C. A. A. (2020). State of the Art Review on Genetics and Precision Medicine in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6615. <https://doi.org/10.3390/ijms21186615>
- Pecorari, I., Mestroni, L., & Sbaizero, O. (2020). Current Understanding of the Role of Cytoskeletal Cross-Linkers in the Onset and Development of Cardiomyopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5865.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165865>
- Platonov, P. G., Haugaa, K. H., Bundgaard, H., Svensson, A., Gilljam, T., Hansen, J., Madsen, T., Holst, A. G., Carlson, J., Lie, Ø. H., Kvistholm Jensen, M., Edvardsen, T., Jensen, H. K., & Svendsen, J. H. (2019). Primary Prevention of Sudden Cardiac Death With Implantable Cardioverter-Defibrillator Therapy in Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*, 123(7), 1156-1162.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.12.049>
- Rasmussen, T. B., Nissen, P. H., Palmfeldt, J., Gehmlich, K., Dalager, S., Jensen, U. B., Kim, W. Y., Heickendorff, L., Mølgaard, H., Jensen, H. K., Baandrup, U. T., Bross, P., & Mogensen, J. (2014). Truncating Plakophilin-2 Mutations in Arrhythmogenic Cardiomyopathy Are Associated With Protein Haploinsufficiency in Both Myocardium and Epidermis. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(3), 230-240.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000338>
- Reichart, D., Magnussen, C., Zeller, T., & Blankenberg, S. (2019). Dilated cardiomyopathy: From epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *Journal of Internal Medicine*, 286(4), 362-372. <https://doi.org/10.1111/joim.12944>

- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I., & Nordet, P. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, *93*(5), 841-842. <https://doi.org/10.1161/01.cir.93.5.841>
- Sanger, J. W., Kang, S., Siebrands, C. C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A. L., & Sanger, J. M. (2006). How to build a myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *26*(6-8), 343-354. <https://doi.org/10.1007/s10974-005-9016-7>
- Sato, P. Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patiño, G. A., Taffet, S. M., Isom, L. L., & Delmar, M. (2009). Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circulation Research*, *105*(6), 523-526. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201418>
- Sattar, Y., Abdullah, H. M., Neisani Samani, E., Myla, M., & Ullah, W. (2019). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An Updated Review of Diagnosis and Management. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.5381>
- Scherr, M., Battmer, K., Blömer, U., Ganser, A., & Grez, M. (2001). Quantitative Determination of Lentiviral Vector Particle Numbers by Real-Time PCR. *BioTechniques*, *31*(3), 520-526. <https://doi.org/10.2144/01313st05>
- Sellers, J. R., & Heissler, S. M. (2019). Nonmuscle myosin-2 isoforms. *Current Biology*, *29*(8), R275-R278. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.022>
- Sen-Chowdhry, S., Prasad, S. K., Syrris, P., Wage, R., Ward, D., Merrifield, R., Smith, G. C., Firmin, D. N., Pennell, D. J., & McKenna, W. J. (2006). Cardiovascular Magnetic Resonance in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Revisited. *Journal of the American College of Cardiology*, *48*(10), 2132-2140. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.045>
- Sit, B., Gutmann, D., & Iskratsch, T. (2019). Costameres, dense plaques and podosomes: The cell matrix adhesions in cardiovascular mechanosensing. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *40*(2), 197-209. <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09529-7>
- Stevens, T. L., Wallace, M. J., El Refaey, M., Roberts, J. D., Koenig, S. N., & Mohler, P. J. (2020). Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Molecular Insights for Improved Therapeutic Design. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, *7*(2), 21. <https://doi.org/10.3390/jcdd7020021>
- Surcel, A., Ng, W. P., West-Foyle, H., Zhu, Q., Ren, Y., Avery, L. B., Krenc, A. K., Meyers, D. J., Rock, R. S., Anders, R. A., Meyers, C. L. F., & Robinson, D. N. (2015). Pharmacological activation of myosin II paralogs to correct cell mechanics defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(5), 1428-1433. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412592112>

- te Riele, A. S., Tandri, H., & Bluemke, D. A. (2014). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC): Cardiovascular magnetic resonance update. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, *16*(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12968-014-0050-8>
- Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L., & Pennelli, N. (1988). Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *The New England Journal of Medicine*, *318*(3), 129-133. <https://doi.org/10.1056/NEJM198801213180301>
- Towbin, J. A., McKenna, W. J., Abrams, D. J., Ackerman, M. J., Calkins, H., Darrieux, F. C. C., Daubert, J. P., de Chillou, C., DePasquale, E. C., Desai, M. Y., Estes, N. A. M., Hua, W., Indik, J. H., Ingles, J., James, C. A., John, R. M., Judge, D. P., Keegan, R., Krahn, A. D., ... Zareba, W. (2019). 2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*, *16*(11), e301-e372. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2019.05.007>
- Uchiyama, Y., Sakaguchi, M., Terabayashi, T., Inenaga, T., Inoue, S., Kobayashi, C., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakagata, N., Sato, Y., Sekiguchi, K., Miki, H., Araki, E., Fujimura, S., Tanaka, S. S., & Nishinakamura, R. (2010). Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(20), 9240-9245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913748107>
- van der Velden, J., & Stienen, G. J. M. (2019). Cardiac Disorders and Pathophysiology of Sarcomeric Proteins. *Physiological Reviews*, *99*(1), 381-426. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2017>
- van der Zwaag, P. A., Jongbloed, J. D. H., van den Berg, M. P., van der Smagt, J. J., Jongbloed, R., Bikker, H., Hofstra, R. M. W., & van Tintelen, J. P. (2009). A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Human Mutation*, *30*(9), 1278-1283. <https://doi.org/10.1002/humu.21064>
- Vidal, M., Cusick, M. E., & Barabási, A.-L. (2011). Interactome Networks and Human Disease. *Cell*, *144*(6), 986-998. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.016>
- Watkins, H., Ashrafian, H., & Redwood, C. (2011). Inherited Cardiomyopathies. *New England Journal of Medicine*, *364*(17), 1643-1656. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0902923>
- Zhao, G., Qiu, Y., Zhang, H. M., & Yang, D. (2019). Intercalated discs: Cellular adhesion and signaling in heart health and diseases. *Heart Failure Reviews*, *24*(1), 115-132. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9743-7>