

Gure bihotzeko kalmodulina

(Calmodulin of our heart)

Arantza Muguruza-Montero^{a,1,2}, Eider Nuñez^{a,1,3}, Ariane Araujo^{1,3},
Sara M-Alicante¹, Alvaro Villarroel^{1,2}, Janire Urrutia^{*1,3}

¹ Kanal Ionikoak Biofisika (UPV/EHU)

² Biofisika Institutua, (UPV/EHU, CSIC)

³ Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU)

^a Egile hauek ekarpen berdina egin dute lan honetan.

LABURPENA: Kaltzioa seinalizazio unibertsaleko mezulari bat da, funtsezko prozesuetan parte hartzen duena, hala nola apoptosian, zelulen proliferazioan eta muskuluen uzkurduan. Prozesu horietan parte hartzen duten proteina askok ioi honen kontzentrazioari erantzuteko kaltzio sensore batekin, kalmodulinarekin (CaM), elkarreragin behar dute. Horrek ehunka proteinaren aktibitatea erregulatzen du bere N- eta C-lobulu bidez, non EF-eskuak aurkeztzen dituen Ca^{2+} -ari lotzeko. Zelulen seinalizazioan CaM-k duen papera hedatuta dagoen arren, haren mutazioek bereziki bihotzari eragiten diote. Izan ere, CaM proteina berdina kodetzen dituzten hiru geneetako edozeinetan gaixotasunak eragiten dituzten mutazioek bihotz-disfuntzio larriak eragiten dituzte, eta horrek kitzikagarritasunaren erregulazioan duen garrantzia adierazten du. Beraz, esku hartzen duten mekanismoen ezagutzak aukera eman dezake adierazpen klinikoei modu kritikoan heltzeko eta kalmodulinopatieta-rako estrategia terapeutikoak garatzen laguntzeko.

HITZ GAKOAK: kalmodulina, kaltzioa, EF-eskuak, kanal ionikoak, arritmia.

ABSTRACT: Calcium is a universal signaling messenger that participates in essential processes such as apoptosis, cell proliferation and muscle contraction. Many of the proteins involved in these processes must interact with a calcium sensor to respond to the changes of concentration of this ion. The best-studied sensor is Calmodulin (CaM). It regulates the activity of hundreds of proteins through its N- and C-lobes, where two EF-hands are located to bind up to four calcium ions. Although the role of CaM in cell signaling is widespread, its mutations are especially recognized through its effects on cardiac function. In fact, disease-causing mutations in any of the three genes that encode the same CaM proteins cause severe cardiac dysfunction, indicating their importance in regulating excitability. Therefore, knowing the mechanisms involved in these diseases can allow a rational approach to clinical manifestations and contribute to the development of therapeutic strategies.

KEYWORDS: Calmodulin, calcium, EF-hands, ion-channel, arrhythmias.

*** Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Janire Urrutia. Kanal Ionikoak Biofisika (48940 Leioa, Bizkaia). – janire.urrutia@ehu.eus – <https://orcid.org/0000-0002-8546-292X>

Nola aipatu / How to cite: Muguruza-Montero, Arantza; Nuñez, Eider; Araujo, Ariane; M-Alicante, Sara; Villarroel, Alvaro; Urrutia, Janire (2022). «Gure bihotzeko kalmodulina». *Ekaia*, 42, 2022, 173-191. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.22935>).

Jasotze-data: 2021, uztailak 30; Onartze-data: 2021, azaroak 2.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2022 UPV/EHU



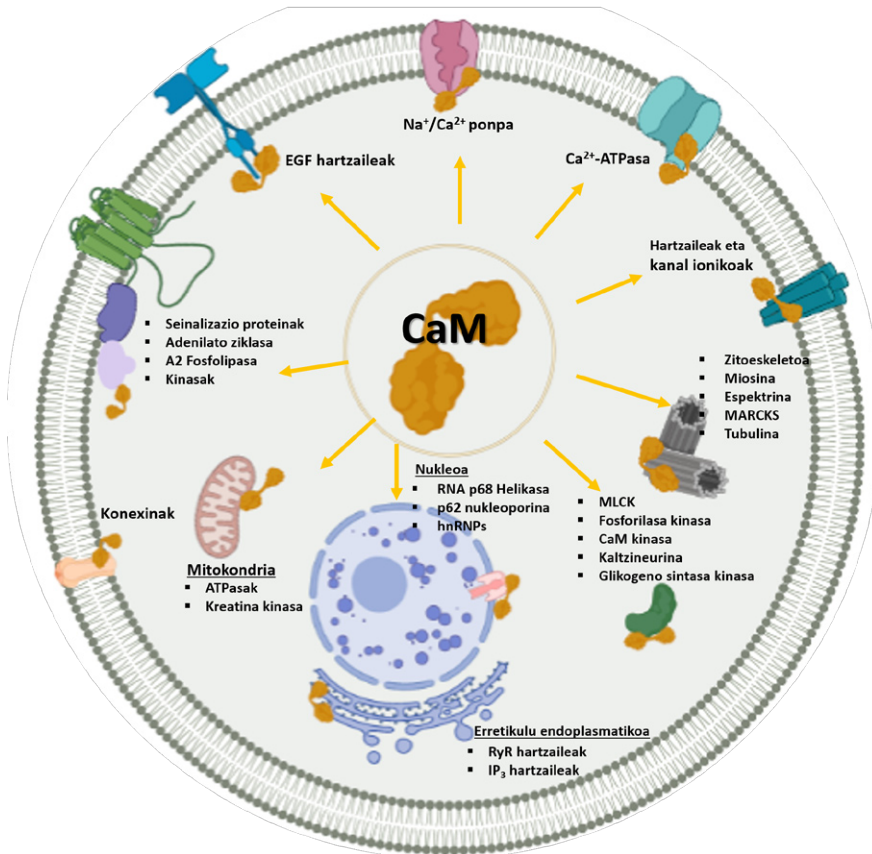
Lan hau Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-LanEratorririkGabe 4.0 Nazioartekoa lizentzia baten mende dago

1. SARRERA

Kalmodulina (CaM) 1970an Cheung eta Kakiuchi ikertzaileek aurkitu zuten, garuneko azido-nukleiko-fosfodiesterasaren Ca^{2+} -mendeko erregulatzaile gisa [1, 2]. Bere egitura moldagarria dela eta, euren artean oso desberdinak diren proteina asko erregula ditzake. Horrela, 300 itu-proteina baino gehiagotara lotzen da, eta itu-proteina bakoitzean erregulazio-mekanismo desberdinak eragiten ditu (1. taula, 1. irudia). Kalmodulina, oso desberdinak diren proteinetan eraldaketa konformazionalak eragiteko gaienez, Ca^{2+} -seinalearen transduktore garrantzitsuena da (2. irudia).

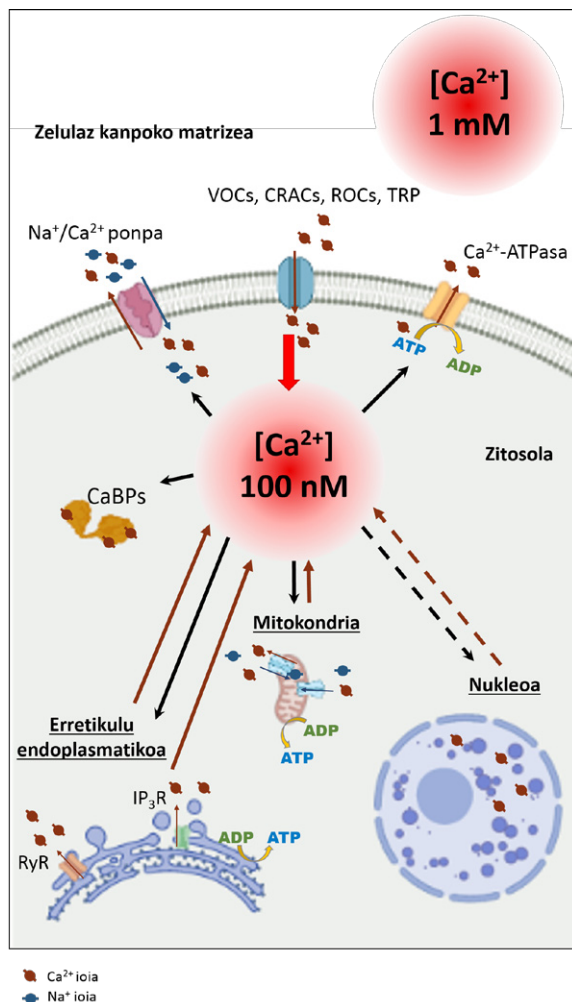
1. taula. Kalmodulinaren itu-proteinak.

Proteina mota	Izena
Kinasak	Miosina kate arineko kinasak (MLCKs) Ca^{2+} -CaM mendeko proteina kinasak (CaMKs) Kinas fosforilasak Fosfofruktokinasak NAD ⁺ kinasak G-proteinei akoplatutako hartzaile kinasak (GRKs) Glikogeno sintasa kinasak
Beste entzima batzuk	Kaltzineurinak Adenilato ziklasak Glutamato deskarboxilasak Oxido Nitriko sintetasa Fosfodiesterasa
Garraiatzaileak	Ca^{2+} -ATPasak $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trukatzailak
Hartzaile erretikularrak	Inositol 1,4,5-trifosfato hartzaileak (IP_3P) Rianodina hartzaileak (RyR)
Kanal ionikoak eta hartzaileak	Kaltzioak aktibatutako konduktantzia txikiko potasio kanalak (SK, IK) Nukleotido ziklikoen menpeko kanalak (CNGs) Potentzial iragankorreko kanalak (TRPs) NMDA errezeptoreak Ca_v kanalak (L, P/Q, R) Na_v kanalak K_v kanalak Hazkunde epidermikoaren faktorearen hartzailea (EGFR) Konexinak (GAP loturak)
Kalmodulina erreseerbako proteinak	Neuromodulina Neurogranina Kalmodulina seinalizazioaren erregulazioa (RCS)
Gene adierazpenerako sistemak	RNA helikasa p68 Erribonukleoproteina heterogeneo nuklearrak (hnRNPs) Nukleopora p62 Kaldesmona, Espektrina, Sintropina, Distrofina, PEP-19
Zitoeskeletoa eta beste proteina batzuk	MAP2, Aduzina, Marck, Tubulina, Miosina, Aktinina...



1. irudia. CaM-k erregulatutako proteinen sarea. CaM-k maila desberdine-tako hainbat prozesu zelular erregulatzen ditu. BioRender.com-ekin egina.

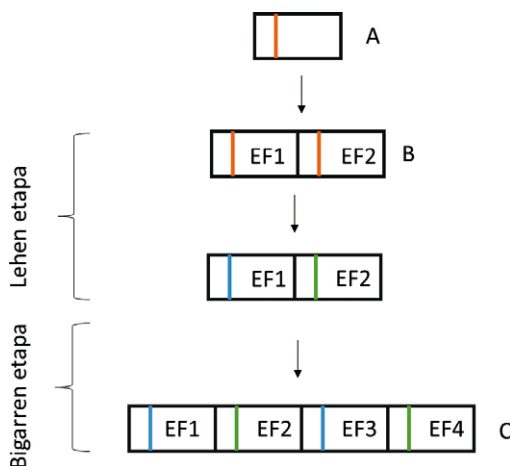
Ca^{2+} -ak funtsezkoak diren hainbat prozesutan parte hartzen du, esaterako, apoptosian, zelula-proliferazioan edota muskulu-uzkurduran [3]. Hortaz, mezulari horren kontzentrazioa zehazki erregulatzea ezinbestekoa da zelularen funtzionamendu egokirako. Atsedean egoeran zitoplasmako Ca^{2+} -aren kontzentrazioa nM tartean mantentzeko zelulak mekanismo bat baino gehiago erabiltzen ditu: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ponpa (NCX), erretikulu endoplasmatikoko mintzean dagoen Ca^{2+} -ATPasak (SERCA) edo zitoplasman Ca^{2+} -a lotzen duten proteina indargetzaileak. Kaltzio atomoaren lotura moldaeraza izaten da; izan ere, proteina askok domeinu espezifikoak dituzte ioi hori lotzeko. Lotura-gune horiek kaltzioarekiko espezifikoak dira, eta egitura-moduluak osatzen dituzte; esaterako, C2 domeinua eta EF-esku motiboa. Azken horiek dira gehien ikertu diren Ca^{2+} -lotura egiturak. EF-eskuak, Kretsingerrek deskribatu zituen lehenengo aldiz parvalbuminan eta ordutik ehunka proteinatan aurkitu dira [4].



2. irudia. Kaltzioaren homeostasia zeluletan. Estimulu baten ondoren, Ca^{2+} -aren kontzentrazioa azkar igotzen da, tentsio-mendeko Ca^{2+} kanalen, hartzailleen bidezko kanalen (*Receptor Operated channels*, ROC), kaltzioaren askapenagatik aktibatutako kanalen (*Calcium Release-Activated Channels*, CRAC) edo hartzaille iragankorren kanal potentzialen (*Transient Receptor Potential Channels*, TRP) bitartez. Gainera, Ca^{2+} gehiago aska daiteke zitoplasmara, eta hala inositol 1,4,5-trifosfatoaren (IP₃R) edo Rianodinaren (RyR) hartzailleak aktibatu. Atsedenean, Ca^{2+} -aren zelula barneko kontzentrazioak μM azpiko mailetan mantentzen dira, mintz plasmatikoa, erretikulu endoplasmatiko edo sarkoplasmatikoa eta mitokondrietan dauden Ca^{2+} -ATPasei eta Na^+/Ca^{2+} ponpei esker. Nukleoko porroak aldiro irekitzen dira, eta Ca^{2+} mailak moteltzen lagun dezakete. Ca^{2+} lotzen duten proteinek (ingelesezko CaBPs) kaltzioaren homeostasian laguntzen dute. BioRender.com-ekin egina.

Euren egitura EF-eskuak dituzten proteinek bi funtzio nagusi betetzen dituzte. Batetik, indargetzaile gisa funtzionatzen dute, zitosoleko Ca^{2+} -kontzentrazioa μM azpiko kontzentrazioetan mantenduz. Bestetik, gai dira ioi horren mezua itu-proteinetara helarazteko; izan ere, euren itu-proteinek ez dute Ca^{2+} -a lotzeko gunerik. Hortaz, proteina horiek indargetzaile baino gehiago kaltzio-sentsoreak dira. Ca^{2+} -aren loturak konformazio aldaketa eragiten du Ca^{2+} -sentsoreetan, prozesu-andana bat aktibatuz. Mota hone-tako proteinetan ikertuena **CaM** da.

Itu-proteinek CaM lotzea ahalbidetzen duten domeinuak (CaMBD) dituzte. Itu-proteinetan CaM-k ezagutzen duen sekuentzia adostua ez badago ere, jakina da halako sekuentziek ezaugarri zehatz batzuk dituztela. Hala nola, helizeak sortzeko joera, karga garbi positiboa eta aminoazido kopuru jakin batez banatutako bi hondar hidrofobiko izatea. CaM lotzeko domeinu ikertuena IQ motiboa da, zeina kanal ionikoetan, miosinan, neurograninan eta neuromodulinan agertzen baita, besteak beste [5]. Hortaz, CaM bi modutan ager daiteke; aske mugi daitekeen seinale moduan (zitosoleko gordekina) edo molekula efektore baten sentsore gisa (gordekin lotua).



3. irudia. CaM-aren sekuentziako aminoazidoen barne-homologia azaltzeko eredu. Eredu honetan, domeinu bateko CaM aitzindari batek (A) lehen bikoizketa intragenikoak jasan zituela onartzen da, 2 domeinuko CaM aitzindaria (B) sortuz. Azken horrek aminoazido ordezkapen batzuk jasan zituen lehen etaparen amaieran, eta bigarren etaparen bigarren bikoizketa jasan zuen 4 domeinuko CaM-aren aitzindari bat emanez (C). Iida 1982-tik moldatua [54].

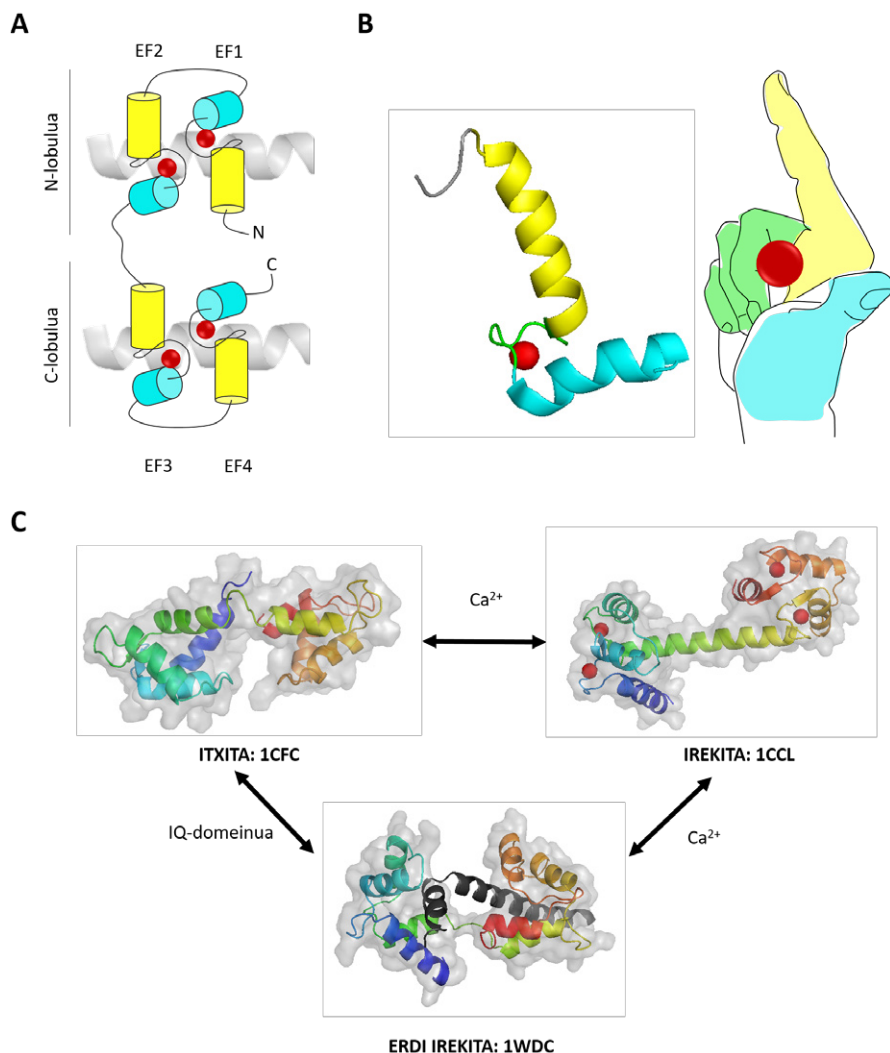
CaM *CALM* geneak kodetzen du. Gene horrek bi bikoizketa jasan zituen tandemean: lehenengo bikoizketaren ondorioz, bi domeinuko proteina

bat sortu zen, eta, homologian oinarrituta, domeinu horiek 1. eta 2. EF-eskuak zirela esan daiteke; bigarren bikoizketan, EF-esku horiek bitan banatu ziren, 3. eta 4. EF-eskuak sortuz. Horrela, gaur egun ezagutzen dugun CaM-ren oso antzekoa den lau domeinuko proteina eratu zen [6] (3. irudia). Ondoren, sekuentzia horrek zenbait ordezkapen eduki zituen onddo, landare eta animalia ornogabeetan; ornodunetan, aldiz, aldaketarik gabe mantendu zen, ugaztunetan izan ezik, CaM kodetzeko hiru gene sortu baitziren arbaso komun batetik [7].

Izaki bizidun guztietan adierazten den proteina denez eta zelularen mekanismo ugaritan parte hartzen duenez, CaM prozesu patologiko desberdinetan nahastuta egoten da; horrela, *kalmodulinopatia* terminoa sortu da *CALM* geneko mutazioek eragindako arritmiak biltzeko.

3. KALMODULINAREN EGITURA

Esan dugunez, CaM-ren egitura oso malgua da, eta horri esker proteina ezberdinen α -helize andanetara lotu egiten da. CaM bi domeinu globularrez osatua dago: N- eta C-lobuluak, oso malgua den begizta batez elkartuak [8-10]. Lobulu bakoitzak bi EF-eskuk osatzen dute (4.A eta B irudiak) eta EF-esku bakoitzak α -helize-begizta- α -helize egitura hartzen du [11]. Bi helize horiek ia ortogonalak dira, eta haien artean dagoen 12 aminoazidoko begiztara lotu daiteke Ca^{2+} atomo bat. CaM-ren lobuluak konfigurazio ireki, erdi ireki edo itxian egon daitezke, Ca^{2+} -aren okupazioaren arabera (4.C irudia). CaM-k Ca^{2+} -a lotzen duenean (apo-CaM-etik holo-CaM-era pasatzean), konformazioa aldatzen du, Ca^{2+} -a lotzeko lobuluak eta poltsiko hidrofobikoak agerian geratzen dira eta itu-proteina ainguratzen du. Horrela, itu-proteinak, CaM-ri lotuta dagoenean, konformazio aldaketa baten ondorioz bere jarduera espezifikoa eraldatuko du. Kanal ionikoen kasuan, itxi edo ireki egingo dira. EF-eskuen sekuentzia kanonikoa 12 aminoazidok osatzen dute, zeina asparragina batekin hasi eta glutamina batekin amaitzen baita. Eskuen lehenengoko aminoazidoak oso garrantzitsuak dira Ca^{2+} -aren loturarako. Izan ere, aminoazido horiek, denak asparraginak, alaninara mutatzeko Ca^{2+} -aren lotura deuseztatzen da [12, 13]. Horrez gain, sekuentzia horren aminoazido erdien oxigeno atomoek (1-3-5-7-9 eta 12 hondarrak) Ca^{2+} -aren loturan parte hartzen dute. Horrela, EF-eskuak mutaturak dituzten CaM-k lanabes gisa erabil daitezke kaltzioaren efektua ikertzeko. Hala ere, mutazio horiek CaM-ren egitura alda dezaketela iradoki izan da. Frogatu da halako mutazioak CaM-ren gainazal erakusgarri hidrofobikoa handitzen dutela eta lobuluen barrena gainazal potentzial elektronegatiboa txikiagotzen dutela. Beraz, nahiz eta lanabes moduan erabil daitezkeen, CaM-ren mutante hauek ez dute apo-CaM guztiz ordezkatzeko, eta itu-proteinekiko dituzten interakzioak eragotz ditzakete [14].



4. irudia. CaM-aren egitura. (A) CaM-ren egitura eskematikoa. Zilindro gris bakoitzak α -helize bat adierazten du, gorriz kaltzioa adierazten da eta helize berdeek CaM-ren itu-proteinak adierazten dituzte. (B) EF-eskuen estruktura eta eskema, ezker-eskuin, hurrenez hurren. (C) CaM-aren egoerak. CaM ortzadar koloreekin koloreztatu da, urdina eta gorria N- eta C-muturrak izanik, hurrenez hurren. CaM-ren azalera gris argiz aurkezten da, eta horren itua, beltzez, egoera erdi irekian.

Zelula barneko baldintza ioniko ia fisiologikoetan, Ca²⁺-arekiko afinitatea, Kd-a, 1 μ M-koa da gutxi gorabehera [15]. Horrela, CaM-k zelula barneko Ca²⁺-a aldatzeko gaitasuna du. Hala ere, afinitate hori aldatu egiten da

CaM bere itu-proteinekin lotzen denean. Oro har, CaM-ren eta Ca^{2+} -aren arteko afinitatea handiagoa da CaM itu-proteina batekin lotuta dagoenean, baina kontrakoa ere deskribatu da [16-19]. Izan ere, konplexuan dagoen CaM-ren Ca^{2+} -afinitatearen balio batzuk 50 nM-tik beherakoak dira. Horrek iradokiko luke zelulak atsedenean daudenean, non Ca^{2+} -kontzentrazioa 100 nM ingurukoa den, CaM/itu-proteinaren konplexua Ca^{2+} -arekin aseta egon daitekeela.

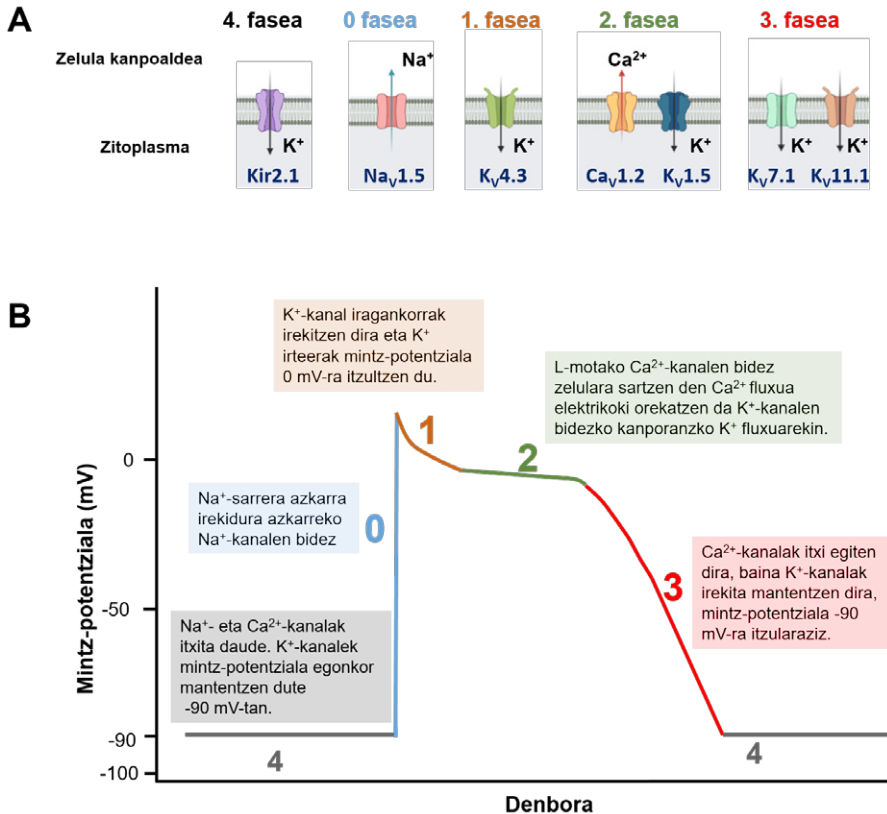
4. BIHOTZ-UZKURDURA

Giza bihotzaren ponpaketa biomekanikoa ekintza-potentzial koordinatuen sekuentzia hertsiki kontrolatu batek gobernatzen du. Ondorioz, bihotz-zelulen taldeak azkar uzkuratzen dira. Zelula mailan, bihotzaren ekintza-potentziala birpolarizazioan barruranzko korrante ionikoetan (IK) eta kanporanzko korranteetan (INa eta ICa) izandako aldaketa ziklikoen ondorioz sortzen da. Bost fasek (0, 1., 2., 3. eta 4. fase deritze) definitzen dute miozitoen ekintza-potentziala (5. irudia).

Potasio ioien (K^+) irteerak sortzen duen korrantea da atsedeen fasearen (4. fasearen) ezaugarri nagusia, Kir2.1 potasio-kanalen bidez sortzen dena; kanal horien bidez, atsedeen-potentziala egonkor mantentzen da. Miozitoak kitzikatu ahala, despolarizazio batek tentsio-mendeko sodio-kanalen ($\text{Na}_v1.5$) irekitzea eragiten du Na^+ sarrera-korrante iragankor bat sortuz (INa) milisegundo gutxi irauten duena eta ekintza-potentzialaren hasiera eragiten duena (0 fasea).

1. fasean, mintz-potentzialaren despolarizazio gehigarri horrek berehala desaktibatzen ditu $\text{Na}_v1.5$ kanal gehienak, eta tentsio-mendeko $\text{K}_v4.3$ eta $\text{K}_v1.4$ K^+ -kanalak aktibatzen ditu; $\text{K}_v1.4$ aurikulan dago nagusiki, eta, horrela, birpolarizazio korrante azkar iragankor bat sortzen da.

2. fasean, $\text{Ca}_v1.2$ kanalen aktibazioak barruranzko Ca^{2+} -korrante bat ahalbidetzen du (ICa_L). Aldi berean, K^+ -kanalen kanporanzko korranteen bidez ($\text{K}_v1.5$ kanalak sortutakoa) mintz-potentziala elektrikoki orekatzen da. 3. Fasean, $\text{Ca}_v1.2$ kanalak ixtearekin batera $\text{K}_v11.1$ eta $\text{K}_v7.1$ sortutako kanporanzko IKR eta IKS K^+ -korranteak nagusitzen dira, eta horrek birpolarizazioa dakar. Azkenik, 4. fasean, Kir2.1 aktibatuz IK1 korrantea berrabiarazteak mintz-potentziala atsedeen-mailara itzultzea ahalbidetzen du.



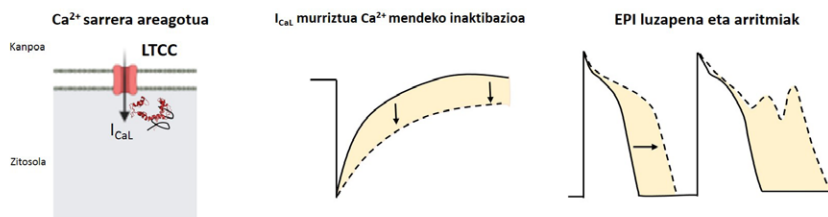
5. irudia. Bihotz-uzkurduraren faseak. (A) Barruranzko eta kanporanzko korronte ionikoak eta horiek osatzen dituzten kanalak. (B) Ekintza-potentzial baten faseen irudikapen eskematikoa eta fase bakoitzean parte hartzen duten kanalen zeregina.

5. CaM-REN MUTAZIOEK ERAGINDAKO FENOTIPO ARRITMIKO NAGUSIAK

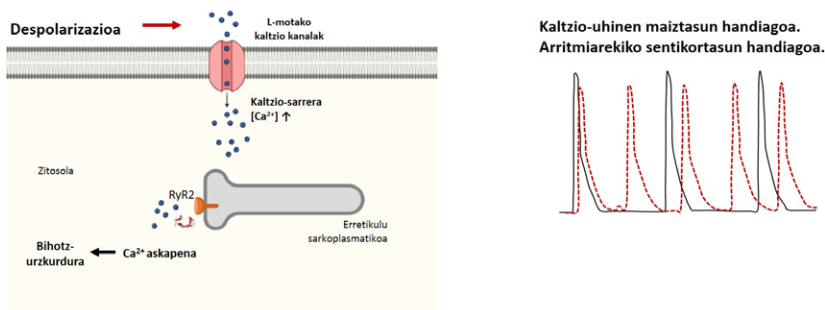
CaM-k funtsezko zeregina du bihotz-uzkurduran, parte hartzen duten proteina askoren funtzioa modulatzeko; hori dela eta, hiru *CALM* geneetan gertatutako mutazioek fenotipo arritmikoak eragiten dituzte. Fenotipo arritmikoen artean 4 desberdinu daitezke: QT luzeko sindromea (ingelesko *Long QT syndrome*, *LQTS*; 6. irudia) birpolarizazioaren luzapenak ezaugarritzen du, [20] eta ariketa fisikoak eragindako arritmia bentrrikularrek karakterizatzen dute [21]; katekolaminek eragindako takikardia bentrrikular polimorfikoa (ingelesko *Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*, *CPVT*; 6. irudia); fibrilazio bentrrikular idiopatikoa (in-

geleseko *Idiopathic Ventricular Fibrillation, IVF*), [22] eta bat-bateko azaldu gabeko heriotza (ingelesezko *Sudden Unexplained Death, SUD*). Fenotipo mistoak dituzten mutazioak ere deskribatu dira [23]. Arritmia horiek bihotzean adierazten diren proteinak kodifikatzen dituzten geneen mutazioen ondorioz sortzen dira. Hala ere, arritmia desberdinen artean, entitate kliniko gisa bereiz daitezkeen talde bat dago, kalmodulinopatia izenpean sailkatua. Kalmodulinopatiek sintomen, arritmia moten, elektrokardiogramaren ezaugarrien eta terapiari emandako erantzunaren arabera bereiz daitezke.

A LQTS CaM



B CPVT CaM



6. irudia. (A) LQTS-CaM-ek I_{CaL} bidez Ca²⁺ kontzentrazioak gora egitea eragiten dute, Ca²⁺ mendeko inaktibazioa (CDI) murrizteagatik; horrek Ca²⁺ gehiago sartzea eragiten du, eta, ondorioz, ekintza-potentzialaren (EPI) eta arritmien iraupena luzatzen da. (LTCC: L motako kaltzio-kanalak), elektrokardiograman QT tartearen luzapena azalduz (B) CPVT-CaM-ek Ca²⁺ erretikulu sarkoplasmatikotik askatzea sustatzen dute, bihotzeko errianodina-hartzaileen bidez (RyR2). Horrek Ca²⁺-uhinen maiztasun handiagoa eta arritmiekiko sentikortasun handiagoa eragiten du, bereziki katekolaminen presentzian, takikardia bentrakularra sortuz (Kotta *et al.*, 2018tik [24] eta Cardiac Inherited Diseases Group-etik moldatua).

CaM funtsezkoa bada ia zelula guztietan kaltzio-seinalea behar bezala interpretatzeko, zergatik *CALM* genearen mutazioek fenotipo kardiako espezifikoak sortzen dituzte bakarrik? *CALM* genearen mutazio horiek modu

espezifikoa eragiten al diete bihotz-proteinei? Hurrengo atalean, galdera horiei erantzuteko asmoz argitaratutako informazioa bildu dugu.

5.1. LQTS fenotipoa

Fenotipo nagusia LQTS da: fenotipoen % 49 osatzen du [25]. Ekin-tza-potentzialaren iraupenaren luzapena, kanporanzko korrontea sortzen duten kanalen funtzio-galeraren edo barruranzko korrontea sortzen dutenen funtzio-irabaziaren ondorio izan daiteke; beraz, batez ere IKS-en eta ICa_L -en aldaketen ondorioz agertzen den fenomeno da. CaM $\text{K}_{V7.1}$ kanal hauen funtzioan eta kanal horrek eragiten duen gaixotasunen biologian garrantzitsua da [26]. Izan ere, proteina horrek zeregin garrantzitsua betetzen du $\text{K}_{V7.1}$ kanalen mihiztaduran. Horrela, CaM beharrezkoa da $\text{K}_{V7.1}$ kanalen tetramero funtzionalen osaketan. CaM loturak kanalarren dimeroak sortzen ditu. Bi dimero elkartzean, tetrameroa osatzen da, $\text{K}_{V7.1}$ funtzionala lortuz [27, 28]. Izan ere, CaM-k kanalarren geneen mutazioen ondorioz $\text{K}_{V7.1}$ -ekin elkarreeragiten ez duenean, horren tetramerizazioa eragozten du. Eragozpen hori kanal funtzio aberrantearekin eta LQTSrekin zuzenean lotuta dago [29]. LQTS eragiten duten CALM-aren mutazioak proteinaren 3. EF-eskuan, 4. EF-eskuan edo C-muturrean nagusiki agertzen dira.

Tentsio-mendeko Ca^{2+} -kanalek zelula barnera Ca^{2+} -sarrera bat eragiten dute. Ioi horrek seinalizazio elektrikoaren bigarren mezulari moduan jotzen du, gertaera zelular desberdin asko eraginez [30]. $\text{Ca}_V1.2$ kanalak hainbat ehunetan adierazten dira. Bihotzeko eta muskulu eskeletikoko kitzikapen-uzkurdura akoplamenduan garrantzitsuak dira, eta neuronetan neurotransmisoreen jariapenean dihardute. Bere azpiunitate nagusiak zelula barneko N- eta C-muturrak dira; azken hori kanalarren erregulaziorako oso garrantzitsua izanik. Izan ere, mutur horrek beste proteinen lotura guñeez gain, CaM lotzeko IQ motiboa du. Apo-CaM kanalaria lotu egiten da, eta Ca^{2+} -a batzeak kanalarren Ca^{2+} /CaM-ren mendeko inaktibazioa eragiten du [31-33]. Inaktibazio hori funtsezkoa da ekin-tza-potentzialaren luzapena mugatzeko; horrez gain, Ca^{2+} -aren homeostasirako beharrezkoa den atzeraelikadura sistema garrantzitsua da [34] (6.A irudia). Horrela, Ca^{2+} -ak kanalarren inaktibazioaren zinetika bizkortzen du [35].

Modulazioari eragiten dioten CaM anormaltasunek ekin-tza-potentzialaren luzapenean eragingo lukete. Izan ere, birpolarizazio atzeratua CALM genearen mutazioek eragindako ICa_L -aren handipenaren ondorioz gertatzen da [34].

Ebidentzia ugaritan oinarrituta, esan daiteke LQTS sortzen duten CALM genearen mutazioek, CaM-ren Ca^{2+} -arekiko duen afinitatea murrizten dutela eta asaldaturako kaltzio mendeko inaktibazioa (KMI) sortzen dutela. Ondorioz, gehiegizko eta kontrolik gabeko Ca^{2+} sarrera-fluxua, ekin-

tza-potentzialaren luzapena, QT tartearen luzapena eta azkenik, hilgarriak izan daitezkeen gertaera arritmogenikoak sortzen dira.

Tentsio-mendeko Na_v1 kanalak bihotzeko ekintza-potentzialen gorkada azkarra sortzen du, baita muskulu eskeletiko eta neurona gehienena ere. Horrela, kanal horiek aktibitate elektrikoaren abiarazleak dira ehun kitzikagarrietan. Na^+ -kanal horiek beste proteina osagarrien bidez erregula daitezke, horien artean CaM-ren bidez. Proteina horrek kanalen mintzerako garraioa eta haien ezaugarri biofisikoak alda ditzake. Na_v kanalen alfa azpiunitatearen C-muturrak, CaM lotzeko IQ motibo batez gain, Ca^{2+} -a zuzenean lotzeko gune bat ere badauka. Ca^{2+} -ak kanalaren aldaketa konformazional bat eragiten du IQ motiboari lotutako CaM-ren N-lobuluan. C-lobulua, ordea, Ca^{2+} -rik gabe lotuta mantentzen da [36]. $\text{Na}_v1.5$ kanalaren IQ motiboan agertzen diren mutazioek bihotzeko kitzikagarritasunean aldaketak sor ditzakete, baita Brugada sindromea (BrS), LQTS edo BrS/LQTS nahastutako fenotipoak sortuz [37-40].

5.2. CPVT fenotipoa

Sodio-kanalen bidez zelulak despolarizatu ondoren, kaltzioa kardiomiozitoetara sartzen da L motako kaltzio-kanalen bidez (6.B irudia). Kaltzioak, ondoren, erretikulu sarkoplasmatikoan dauden errianodina-hartzaileak aktibatzen ditu. Hartzaile berezi horrek zelula barneko kaltzioa antzeman, eta erretikulu sarkoplasmatikoko kaltzioaren askapena eragiten du, zelulan kaltzioaren eskuragarritasuna are gehiago handituz [41-44]. Kanal horiek faktore askoren bidez erregula daitezke: Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP, CaM, proteina kinasen, fosfatasen eta erredox espezie aktiboen bidez, besteak beste. CaM-k erretikulu sarkoplasmatikotik askatzen den Ca^{2+} -a erregulatzen du, RyR-ri zuzenean lotzen baitzaio. Ikusi da Ca^{2+} -kontzentrazio librea altua denean CaM-k kanal hauek inhibitzen dituela, baina kontzentrazio hori baxua denean, CaM-k inhibitu edo aktibatu egiten duela hartzailea, horren isoformaren arabera [34, 45-47]. Arritmia horren forma prototipikoa RyR2 edo horiei lotutako proteinak kodifikatzen duten geneen mutazioekin erlazionatu da. Kasu horretan, *CALM* genearen mutazio batzuek ez dituzte CaM-ren Ca^{2+} -lotura propietateak erasaten, baizik eta CaM-ren eta RyR2-ren arteko lotura kidetasuna indartzen dute, RyR2-ren egitura irekia sustatuz eta bere erregulazio fina eragotziz. CaM-ren eta RyR2-ren arteko interakzio disfuntzionalak gertatzen direnean, erretikulu sarkoplasmatikoko Ca^{2+} edukia deserregulatu egiten da, eta, ondorioz, erretikulu sarkoplasmatikotik Ca^{2+} -askapen goiztiar eta espontaneoak gertatzen dira [48] (6.B irudia).

Beraz, CPVTren oinarria RyR2-ren berezko irekitzetik sortzen diren Ca^{2+} -uhin makroskopikoen ondorioz datorren zelula osoko asaldura ionikoaren hedapena litzateke (Ca^{2+} -ak eragindako Ca^{2+} -askapenagatik) [49].

5.3. Fenotipo mistoa

Maiztasun askoz gutxiagorekin agertzen den fenotipoa da. $\text{Ca}_v1.2$ eta RyR2 kanalei eragiten dieten CaM anomalien demarkazioa itxuraz garbia izan arren, kasu batzuetan LQTS fenotipoari esleitzen zaizkion arritmia CPVT fenotipoak dira, erretikulu sarkoplasmatikoaren ezegonkortasuna iradokitzen dutelako [23]. Hala ere, kontuan hartu behar da ICa_L -ren KM ren narriadura eta horren ondoriozko ekintza-potentzialaren luzapena zelula barneko Ca^{2+} homeostasian ondorioak eduki ditzakeela eta horri aurre egiteko konpentsazio-mekanismo sendoak behar dituztela. Konpentsazio horrek eraginkortasun txikiagokoa den subjektuetan (edo baldintzetan) gaixotasuna sor dezake. Beraz, LQTS edo CPVT fenotipo kliniko bati esleitzea ez da beti baliagarria arritmogenesia azaltzen duen mutazioak eragindako anomalia definitzeko [34].

2. taula. Kalmodulina genearen mutazioek eragindako fenotipoak.

Fenotipoa	Kausa	CALM mutazioa	Kanal kaltetua	Sintomak
LQTS	Tetramerizazioaren eragozpena CaM -ren lotura faltagatik	3. EF-eskuan, 4. EF-eskuan edo C-muturrean	$\text{Cav}1.2$ $\text{Nav}1.5$ $\text{Kv}7, \text{Kv}11$	Ekintza-potentzialaren luzapena, QT tartearen luzapena eta hilgarriak izan daitezkeen gertaera arritmogenikoak
CPVT	CaM eta RyR2 arteko lotura disfunczionala	RyR2 -ren CaM -ren lotura gunean	RyR2	Takikardia bentrikularra, sinkopeak eta bat-bateko heriotzak.
MISTOA	Erretikulu sarkoplasmatikorenezegonkortasuna (Ca^{2+} -ren homeostasiaren galera)	3. EF-eskuan	$\text{Cav}1.2$ RyR2	QT tartearen luzapena eta hilgarriak izan daitezkeen gertaera arritmogenikoak

6. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNERAKO ERRONKAK

Fenotipoak alde batera utzita, orain arte identifikatutako *CALM* mutazio guztien ezaugarri komunetako bat gaixotasunaren agerpenen eta agerpen goiztiarraren muturreko larritasuna da [50].

CaM -ren interakzio-sarea oso zabala denez, zaila da zuzeneko loturak identifikatzea kalmodulinopatiaren adierazpen klinikoen eta horien azpiko oinarri molekularren artean. Zenbait hipotesi formulatu diren arren, kalmodulinopatiaren mekanismo molekular nagusien eta fenotipo kliniko larriak eragiten dituzten arrazoien ezagutza sakona falta da. Gaixotasunaren

adierazpenen larritasuna azaltzeko hipotesia sinergikoki ager litezkeen bi mekanismotan oinarritzen da. CaM-en % 99 beren ituekin lotuta daudela kontuan hartuta, CaM mutanteak ere ituei lotuta egongo direla aurreikus dezakegu. Hala ere, hipotesi horrek, berez, eta batez ere ondorengo bitartekari asko daudenean, ezin du erabat azaldu adierazpen klinikoaren kanalizazioa bi fenotipo nagusitan azaltzea, ezta mutazio berdinak fenotipo ezberdinak erakustea. Arrazoiak, neurri batean, bigarren mekanismo batengatik ere izan daiteke, apo-CaM-k bere ituekin duen elkarreragin molekularren albo-ondorioak barne hartzen baititu. Badaude mutazio batzuk Ca^{2+} -arekiko lotura-afinitatea txikitzen dutenak. Hala ere, mutazio horiek ez dute CaM/itu-proteina konplexuan eragina izango CaM apo-CaM moduan lotzen den kasuetan, probabilitate handiagoan aurkituko baita CaM kaltziorik gabe [24].

Esan bezala, CaM-k Ca^{2+} -sentsore bezala funtzionatzen du zeluletan, Ca^{2+} maila fisiologikoak mantentzeko. Funtzio homeostatiko horrez gain, CaM seinaleak hautatu behar dira funtsezko prozesu zelularrak transduzitzeko, zeinentzat Ca^{2+} /CaM konplexua ez den nahitaez beharrezkoa baina oraindik eragin modulatzailerak izan dezakeen. Hori posible da CaM-ekiko lotura-sekuentzia egokien presentziagatik, CaM-ek bere apo egoeran ere itu anitzekin bat egitea ahalbidetzen baitu; horrek «aurrez lotutako» CaM erreserba bat sortzen du. CaM-k ituei espezifikotasun oso handiarekin lotzen zaizkie, CaM mutazioen fenotipoa miokardiora bakarrik mugatzen dela azalduz [24].

Aurretik berrikusitako informazioan oinarrituta, kalmodulinopatiek eragindako gaixotasunei heltzeko mekanismoen bidez gidatutako ikuspegi terapeutikoei CaM mutanteen eta haien ituen arteko interakzioa modu idealean jorratu beharko lukete. Ikuspegi klasikoagoak dituzten CaM mutazioen terapia fenotipoaren arabera izan daiteke. ICa_L funtzio-irabaziaren kasuan, horien blokeatzaileak, berapamiloa kasu, erabiltzen dira QT tartearen laburtzen duena. Hala ere, ICa_L korrontearen inhibizio selektiboa desiragarria izango litzateke, eta horretarako ICa_L blokeatzaile espezifikoagoak garatzea lortu beharko lirateke [24, 34]. IK_S eta INa_v -en jarduera kontrolatzeko β -blokeatzaile mota desberdinak erabiltzen dira pazienteek aurkeztzen dituzten arazo klinikoaren arabera (Etheridge *et al.*, 2019-n berrikusita [51]).

CPVT-CaM-en tratamendu farmakologikoak RyR2 egonkortzearen bidez eman daitezke. Helburu hori aspalditik lortu nahi izan da, eta orain arte ez da tresna idealik garatu horretarako; flekainida edo karbedilola bezalako farmakoek nolabaiteko babesa eman dezakete; klinikoki erabilgarriak diren RyR2 blokeatzaile espezifikoaren bilaketa abian da.

Zalantzarik gabe, kalmodulinopatiek diziplina anitzeko ikerketak erakari dituzte; hala ere, oraindik galdera asko daude jorratzeko. CaM mu-

tazioen eta RyR2-ren disfunczioaren oinarri molekularra argitu gabe dago oraindik, eta horrek terapia mekanismo espezifikoak identifikatzea eragozten du. Etorkizunean, nukleasa proteina-9-ri lotutako CRISPR (Cas 9) teknikaren bidez CPVTren mekanismoa ezagutzea ahalbidetuko digula espero dugu. Metodo honen bidez gizakien zelula ama pluripotente induzituen geneak eraldatzen dira CPVTekin erlazionaturiko mutazioak sortuz. Zelula horiek kardiomiotoetan desberdintzen dira geroago mutazio horiek zelula espezializatuetan duten eragina aztertzeko. Garapenean dauden beste teknika batzuek ere mutazio patologikoen karakterizazioan eta farmako probetan lagunduko dute. Horren adibide da optogenetika, hau da, argiarekiko sentikorrek diren proteinak iturri genetikoaren estrategiekin konbinatzea. Izan ere, argiarekin aktibatu eta desaktibatu daitezkeen bihotz modelo garatu izan da *C. elegans* oinarritzko espeziesean CPVT mutazioak ezaugarritzeko [52] (Pflaumer *et al.*, 2020-n berrikusia [53]).

7. FINANTZAZIOA

AM-M UPV/EHUK kudeatutako Eusko Jaurlaritzaren doktorego aurreko beka baten onuraduna da, EN eta AA ELKARTEK proiektu bati esker (KK-2020/00110) daude finantzatuta.

8. ESKER ONAK

Artikulu hau UPV/EHUK eta Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Sailak emandako diru-laguntzaren bidez egin da.

BIBLIOGRAFIA

- [1] CHEUNG, W. Y. 1970. «Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **38**, 533-538.
- [2] KAKIUCHI, S., YAMAZAKI, R. 1970. «Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **41**, 1104-1110.
- [3] IKURA, M., CLORE, G., GRONENBORN, A., ZHU, G., KLEE, C., BAX, A. 1992. «Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR». *Science*, **256**, 632-638.
- [4] KRETSINGER, R. H., NICKOLDS, C. E., COFFEE, C. J., BRADSHAW, R. A. 1972. «The Structure of a Calcium-binding Protein from Carp Muscle». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **36**, 217-220.
- [5] BÄHLER, M., RHOADS, A. 2002. «Calmodulin signaling via the IQ motif». *FEBS Letters*, **513**, 107-113.

- [6] M L BABA, M GOODMAN, J BERGER-COHN, J G DEMAILLE, G. M. 1984. «The early adaptive evolution of calmodulin». *Molecular Biology and Evolution*, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040330.
- [7] TOUTENHOOFD, S. L., FOLETTI, D., WICKI, R., RHYNER, J. A., GARCIA, F., TOLON, R., STREHLER, E. E. 1998. «Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALMS». *Cell Calcium*, **23**, 323-338.
- [8] MEADOR, W., MEANS, A., QUIOCHO, F. 1992. «Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex». *Science*, **257**, 1251-1255.
- [9] MEADOR, W., MEANS, A., QUIOCHO, F. 1993. «Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures». *Science*, **262**, 1718-1721.
- [10] BABU, Y. S., SACK, J. S., GREENHOUGH, T. J., BUGG, C. E., MEANS, A. R., COOK, W. J. 1985. «Three-dimensional structure of calmodulin». *Nature*, **315**, 37-40.
- [11] GIFFORD, J. L., WALSH, M. P., VOGEL, H. J. 2007. «Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs». *Biochemical Journal*, **405**, 199-221.
- [12] GEISER, J. R., VAN TUINEN, D., BROCKERHOFF, S. E., NEFF, M. M., DAVIS, T. N. 1991. «Can calmodulin function without binding calcium?». *Cell*, **65**, 949-959.
- [13] XIA, X.-M., FAKLER, B., RIVARD, A., WAYMAN, G., JOHNSON-PAIS, T., KEEN, J. E., ISHII, T., HIRSCHBERG, B., BOND, C. T., LUTSENKO, S., MAYLIE, J., ADELMAN, J. P. 1998. «Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels». *Nature*, **395**, 503-507.
- [14] PIAZZA, M., TAIKINA, V., DIECKMANN, T., GUILLEMETTE, J. G. 2017. «Structural Consequences of Calmodulin EF Hand Mutations». *Biochemistry*, **56**, 944-956.
- [15] VILLARROEL, A., TAGLIALATELA, M., BERNARDO-SEISDEDOS, G., ALAIMO, A., AGIRRE, J., ALBERDI, A., GOMIS-PEREZ, C., SOLDOVIERI, M. V., AMBROSINO, P., MALO, C., ARESO, P. 2014. «The Ever Changing Moods of Calmodulin: How Structural Plasticity Entails Transductional Adaptability». *Journal of Molecular Biology*, **426**, 2717-2735.
- [16] SACHYANI, D., DVIR, M., STRULOVICH, R., TRIA, G., TOBELAIM, W., PERETZ, A., PONGS, O., SVERGUN, D., ATTALI, B., HIRSCH, J. A. 2014. «Structural Basis of a Kv7.1 Potassium Channel Gating Module: Studies of the Intracellular C-Terminal Domain in Complex with Calmodulin». *Structure*, **22**, 1582-1594.
- [17] CHANG, A., ABDEREMANE-ALI, F., HURA, G. L., ROSSEN, N. D., GATE, R. E., MINOR, D. L. 2018. «A Calmodulin C-Lobe Ca²⁺-Dependent Switch Governs Kv7 Channel Function». *Neuron*, **97**, 836-852.e6.
- [18] TOBELAIM, W. S., DVIR, M., LEBEL, G., CUI, M., BUKI, T., PERETZ, A., MA-ROM, M., HAITIN, Y., LOGOTHETIS, D. E., HIRSCH, J. A., ATTALI, B. 2017.

- «Ca²⁺-Calmodulin and PIP₂ interactions at the proximal C-terminus of Kv7 channels». *Channels*, **11**, 686-695.
- [19] BERNARDO-SEISDEDOS, G., NUÑEZ, E., GOMIS-PEREZ, C., MALO, C., VILLARROEL, Á., MILLET, O. 2018. «Structural basis and energy landscape for the Ca²⁺ gating and calmodulation of the Kv7.2 K⁺ channel». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, 2395-2400.
- [20] SCHWARTZ, P. J., CROTTI, L., INSOLIA, R. 2012. «Long-QT Syndrome». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, **5**, 868-877.
- [21] SØNDERGAARD, M. T., TIAN, X., LIU, Y., WANG, R., CHAZIN, W. J., CHEN, S. R. W., OVERGAARD, M. T. 2015. «Arrhythmogenic Calmodulin Mutations Affect the Activation and Termination of Cardiac Ryanodine Receptor-mediated Ca²⁺ Release». *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 26151-26162.
- [22] MARSMAN, R. F., BARC, J., BEEKMAN, L., ALDERS, M., DOOIJES, D., VAN DEN WIJNGAARD, A., RATBI, I., SEFIANI, A., BHUIYAN, Z. A., WILDE, A. A. M., BEZZINA, C. R. 2014. «A Mutation in CALM1 Encoding Calmodulin in Familial Idiopathic Ventricular Fibrillation in Childhood and Adolescence». *Journal of the American College of Cardiology*, **63**, 259-266.
- [23] MAKITA, N., YAGIHARA, N., CROTTI, L., JOHNSON, C. N., BECKMANN, B.-M., ROH, M. S., SHIGEMIZU, D., LICHTNER, P., ISHIKAWA, T., AIBA, T., HOMFRAY, T., BEHR, E. R., KLUG, D., DENJOY, I., MASTANTUONO, E., THEISEN, D., TSUNODA, T., SATAKE, W., TODA, T., NAKAGAWA, H., TSUJI, Y., TSUCHIYA, T., YAMAMOTO, H., MIYAMOTO, Y., ENDO, N., KIMURA, A., OZAKI, K., MOTOMURA, H., SUDA, K., TANAKA, T., SCHWARTZ, P. J., MEITINGER, T., KAAB, S., GUICHENEY, P., SHIMIZU, W., BHUIYAN, Z. A., WATANABE, H., CHAZIN, W. J., GEORGE, A. L. 2014. «Novel Calmodulin Mutations Associated With Congenital Arrhythmia Susceptibility». *Circulation: Cardiovascular Genetics*, **7**, 466-474.
- [24] KOTTA, M.-C., SALA, L., GHIDONI, A., BADONE, B., RONCHI, C., PARATI, G., ZAZA, A., CROTTI, L. 2018. «Calmodulinopathy: A Novel, Life-Threatening Clinical Entity Affecting the Young». *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **5**, DOI: 10.3389/fcvm.2018.00175.
- [25] NYEGAARD, M., OVERGAARD, M. T. 2019. «The International Calmodulinopathy Registry: recording the diverse phenotypic spectrum of un-CALM hearts». *European Heart Journal*, **40**, 2976-2978.
- [26] SUN, J., MACKINNON, R. 2017. «Cryo-EM Structure of a KCNQ1/CaM Complex Reveals Insights into Congenital Long QT Syndrome». *Cell*, **169**, 1042-1050.e9.
- [27] GHOSH, S., NUNZIATO, D. A., PITT, G. S. 2006. «KCNQ1 Assembly and Function Is Blocked by Long-QT Syndrome Mutations That Disrupt Interaction With Calmodulin». *Circulation Research*, **98**, 1048-1054.
- [28] SHAMGAR, L., MA, L., SCHMITT, N., HAITIN, Y., PERETZ, A., WIENER, R., HIRSCH, J., PONGS, O., ATTALI, B. 2006. «Calmodulin Is Essential for Cardiac I K_S Channel Gating and Assembly». *Circulation Research*, **98**, 1055-1063.

- [29] MARSHALL, C. B., NISHIKAWA, T., OSAWA, M., STATHOPOULOS, P. B., IKURA, M. 2015. «Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **460**, 5-21.
- [30] CATTERALL, W. A. 2011. «Voltage-Gated Calcium Channels». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, a003947-a003947.
- [31] PETERSON, B. Z., DEMARIA, C. D., YUE, D. T. 1999. «Calmodulin Is the Ca^{2+} Sensor for Ca^{2+} -Dependent Inactivation of L-Type Calcium Channels». *Neuron*, **22**, 549-558.
- [32] QIN, N., OLCESE, R., BRANSBY, M., LIN, T., BIRNBAUMER, L. 1999. « Ca^{2+} -induced inhibition of the cardiac Ca^{2+} channel depends on calmodulin». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 2435-2438.
- [33] ZÜHLKE, R. D., PITT, G. S., DEISSEROTH, K., TSIEN, R. W., REUTER, H. 1999. «Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels». *Nature*, **399**, 159-162.
- [34] BADONE, B., RONCHI, C., KOTTA, M.-C., SALA, L., GHIDONI, A., CROTTI, L., ZAZA, A. 2018. «Calmodulinopathy: Functional Effects of CALM Mutations and Their Relationship With Clinical Phenotypes». *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **5**, DOI: 10.3389/fcvm.2018.00176.
- [35] BEN-JOHNY, M., YUE, D. T. 2014. «Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels». *Journal of General Physiology*, **143**, 679-692.
- [36] PITT, G. S., LEE, S.-Y. 2016. «Current view on regulation of voltage-gated sodium channels by calcium and auxiliary proteins». *Protein Science*, **25**, 1573-1584.
- [37] YAN, H., WANG, C., MARX, S. O., PITT, G. S. 2017. «Calmodulin limits pathogenic Na^+ channel persistent current». *Journal of General Physiology*, **149**, 277-293.
- [38] ABDELSAYED, M., BARUTEAU, A.-E., GIBBS, K., SANATANI, S., KRAHN, A. D., PROBST, V., RUBEN, P. C. 2017. «Differential calcium sensitivity in Na V 1.5 mixed syndrome mutants». *The Journal of Physiology*, **595**, 6165-6186.
- [39] CHAGOT, B., CHAZIN, W. J. 2011. «Solution NMR Structure of Apo-Calmodulin in Complex with the IQ Motif of Human Cardiac Sodium Channel NaV1.5». *Journal of Molecular Biology*, **406**, 106-119.
- [40] GABELLI, S. B., YODER, J. B., TOMASELLI, G. F., AMZEL, L. M. 2016. «Calmodulin and Ca^{2+} control of voltage gated Na^+ channels». *Channels*, **10**, 45-54.
- [41] FRANZINI-ARMSTRONG, C., PROTASI, F. 1997. «Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions». *Physiological Reviews*, **77**, 699-729.
- [42] HAMILTON, S. L., SERYSHEVA, I. I. 2009. «Ryanodine Receptor Structure: Progress and Challenges». *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 4047-4051.
- [43] CLARKE, O. B., HENDRICKSON, W. A. 2016. «Structures of the colossal RyR1 calcium release channel». *Current Opinion in Structural Biology*, **39**, 144-152.

- [44] MEISSNER, G. 1994. «Ryanodine Receptor/Ca²⁺ Release Channels and Their Regulation by Endogenous Effectors». *Annual Review of Physiology*, **56**, 485-508.
- [45] XIONG, L.-W., NEWMAN, R. A., RODNEY, G. G., THOMAS, O., ZHANG, J.-Z., PERSECHINI, A., SHEA, M. A., HAMILTON, S. L. 2002. «Lobe-dependent Regulation of Ryanodine Receptor Type 1 by Calmodulin». *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 40862-40870.
- [46] YAMAGUCHI, N., XU, L., PASEK, D. A., EVANS, K. E., CHEN, S. R. W., MEISSNER, G. 2005. «Calmodulin Regulation and Identification of Calmodulin Binding Region of Type-3 Ryanodine Receptor Calcium Release Channel». *Biochemistry*, **44**, 15074-15081.
- [47] BALSHAW, D. M., XU, L., YAMAGUCHI, N., PASEK, D. A., MEISSNER, G. 2001. «Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor)». *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 20144-20153.
- [48] HWANG, H. S., NITU, F. R., YANG, Y., WALWEEL, K., PEREIRA, L., JOHNSON, C. N., FAGGIONI, M., CHAZIN, W. J., LAVER, D., GEORGE, A. L., CORNEA, R. L., BERS, D. M., KNOLLMANN, B. C. 2014. «Divergent Regulation of Ryanodine Receptor 2 Calcium Release Channels by Arrhythmogenic Human Calmodulin Missense Mutants». *Circulation Research*, **114**, 1114-1124.
- [49] ZAZA, A., ROCCHETTI, M. 2014. «Calcium Store Stability as an Antiarrhythmic Endpoint». *Current Pharmaceutical Design*, **21**, 1053-1061.
- [50] CROTTI, L., LAHTINEN, A. M., SPAZZOLINI, C., MASTANTUONO, E., MONTI, M. C., MORASSUTTO, C., PARATI, G., HERADIEN, M., GOOSEN, A., LICHTNER, P., MEITINGER, T., BRINK, P. A., KONTULA, K., SWAN, H., SCHWARTZ, P. J. 2016. «Genetic Modifiers for the Long-QT Syndrome». *Circulation: Cardiovascular Genetics*, **9**, 330-339.
- [51] ETHERIDGE, S. P., ASAKI, S. Y., NIU, M. C.-I. 2019. «A personalized approach to long QT syndrome». *Current Opinion in Cardiology*, **34**, 46-56.
- [52] FISCHER, E., GOTTSCHALK, A., SCHÜLER, C. 2017. «An optogenetic arrhythmia model to study catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutations». *Scientific Reports*, **7**, 17514.
- [53] PFLAUMER, A., WILDE, A. A. M., CHARAFEDDINE, F., DAVIS, A. M. 2020. «50 Years of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) – Time to Explore the Dark Side of the Moon». *Heart, Lung and Circulation*, **29**, 520-528.
- [54] IIDA, Y. 1982. «Molecular evolution of protein». *Journal of Molecular Biology*, **159**, 167-177.