

# Financing of Translational Research Projects

## Document B: Project Report

### I. General Data

Registration Number:

Project Title: <b>Genetic and functional bases of PITX2 involvement in human atrial fibrillation</b>
Name of the Coordinator Centre: <b>CNIC</b>
Name and surnames of the Principal Investigator – Coordinator: Miguel Manzanares Fourcade
Number of Participant Groups: 4

### II. Scientific Summary of the Project

The summary must include: Objectives, methodology and working hypothesis (500 words max.)

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia. Despite its high frequency occurrence, current knowledge on the genetic bases of atrial fibrillation remains scarce. Point-mutations in potassium channel encoding genes have been associated with familial AF, but account for only a small fraction of all cases of AF (<10%). More recently, common mutations in the human chromosome 4q25 have been associated to human atrial fibrillation (>30%) and proposed to regulate the activity of the adjacent transcription factor PITX2. Thus it is likely that PITX2 expression/activity might be related to AF associated risk variants, and thus that PITX2 impairment would play a crucial role in atrial electrical remodeling and thus AF.

The genetic association of AF to PITX2 indicates that this gene lies at a key position of those regulatory networks whose alteration underlies the disease. As a transcription factor, PITX2 will regulate the expression of multiple downstream targets, many of which will be altered in those patients with the risk-associated variants. Our preliminary data indicate that PITX2c expression is reduced in the atrial chambers of AF patients. Such decreased PITX2c expression correlates with impaired expression of gap junction components, whose alterations can thus result in changes to the electrical activity of the myocardium, and hence in AF. Furthermore, PITX2 can be acting through microRNAs (miRNAs), a group of recently described short RNA molecules, to fine-tune the amount of messenger RNAs coding for components of the pathway. In addition, preliminary data shows that in mouse models, a reduction of Pitx2 activity can lead to the structural remodeling of the heart, leading to atrial chamber dilation, which in turn can directly or indirectly through changes to electrical activity, also have an impact on the appearance of AF.

In summary, these findings open a unique opportunity to understand the genetic circuitry underlying AF, and by using the genetic network up and downstream of PITX2, learn which are the pathways altered and identify new possible targets for intervention, and establish novel animal and in vitro cell culture models that parallel the molecular and electrophysiological abnormalities of AF in humans. The global purpose of this project is therefore to get insights into the role of Pitx2 in atrial fibrillation, by combining genetic, molecular, electrophysiological, and computational approaches using both human samples as well as experimental models to test the hypotheses that, on the one hand, risk factor variants play a role in regulating the PITX2 expression in the heart and, on the other hand, that PITX2 controls a regulatory network that if impaired can lead to abnormal atrial electrical remodeling and/or cell-to-cell signalling causative of atrial fibrillation. For this, the present project puts together the previous expertise of different basic and clinically-oriented research groups to tackle the global understanding of PITX2 and its role in AF.

### III. Scientific Report of the Project

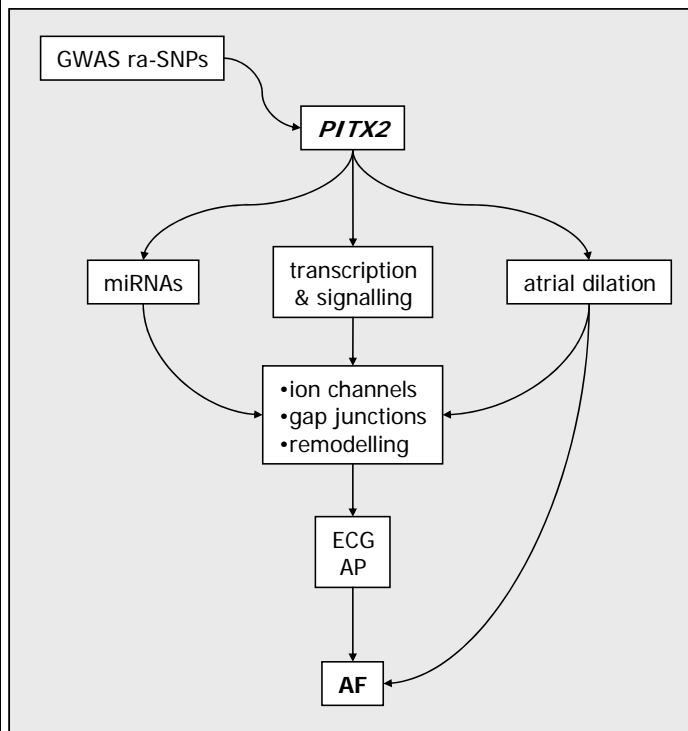
The report must include the following epigraphs:

- General introduction to the subject of research (1,000 words max.)
- General objectives (500 words max.)
- Work plan (500 words max.)
- General schedule (one page)

#### General introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia. Several epidemiological studies have provided evidences that AF can affect between 5-6% of the general population older than 65 years, increasing thereby the mortality rate in elderly people. Furthermore, AF is frequently linked to systemic embolism in these patients, provoking higher rate of mortality and morbidity. A characteristic feature of atrial fibrillation is the propensity of the arrhythmia to self-mainting. Indeed, current clinical practice shows that the successful reversion rate of acute AF is inversely related to the previous duration of the arrhythmic episode, and experimental models settled the concept of domestication of atrial fibrillation as the arrhythmia episode lasted longer.

Albeit the high prevalence of AF in the general population, scarce information is available regarding the molecular mechanisms or the genetic contribution to AF. Several reports have described point-mutations in potassium-channel genes associated with familial AF but account for only a small fraction (<10%) of all cases of AF. Recently, a genome-wide association study have reported two risk variants on chromosome 4q25 that are strongly associated with AF (30-40%) in three distinct populations of European descent (Gudbjartsson et al., 2007). These variants did not show association to known risk factors for AF such as obesity, hypertension or myocardial infarction and the reported SNP variants are located in a genomic gene desert. However, the gene PITX2, which plays a key role in asymmetric morphogenesis during cardiac development in mouse, is adjacent to the segment on 4q25 containing the genetic variants. Thus it is likely that PITX2 expression/activity might be related to AF associated risk variants, and thus that PITX2 impairment would play a crucial role in atrial electrical remodeling and thus AF. This finding opens a unique opportunity to understand the genetic circuitry underlying AF, and by using the genetic network up and downstream of PITX2, learn which are the pathways altered and identify new possible targets for intervention, and establish novel animal and in vitro cell culture models that parallel the molecular and electrophysiological abnormalities of AF in humans. Such are the aims of this project (Fig. 1).



**Fig. 1: The role of PITX2 in atrial fibrillation.** This diagram shows the different pathways that can be affected by PITX2 in the occurrence of atrial fibrillation that will be addressed in this project. This can occur either by direct transcription controls of targets and/or signalling pathways involved in electrical activity, or secondarily through miRNAs. Another pathway would be mediated by structural alterations, such as atrial dilation, that could then affect directly or indirectly the electrical activity of the atria chambers resulting on the onset of AF. GWAS, genome-wide association studies; ra-SNPs, risk-associated single nucleotide polymorphisms; ECG, electrocardiogram; AP, action potential; AF, atrial fibrillation.

The genetic association of AF to PITX2 indicates that this gene lies at a key position of those regulatory networks whose alteration underlies the disease. Being a transcription factor, PITX2 will regulate the expression of multiple downstream targets, many of which will be altered in those patients with the risk-associated variants, which have been hypothesized to lead to changes in PITX2 expression (Damani et al., 2009). Indeed, preliminary results from one of the members of this consortium (Diego Franco) indicate that the expression of the PITX2c isoform is reduced in both right and left atria of AF patients. Some of these targets might include ion channels and gap junction components, whose alterations can result in changes to the electrical activity of the myocardium, and hence in AF. Furthermore, PITX2 can be acting through micro RNAs (miRNAs), a group of recently described short RNA molecules, to fine-tune the amount of messenger RNAs coding for components of the pathway. Finally, preliminary data shows that in mouse models, a reduction of Pitx2 activity can lead to the structural remodeling of the heart, and result in atrial dilation that could directly, or indirectly through changes to electrical activity, also have an impact on the appearance of AF.

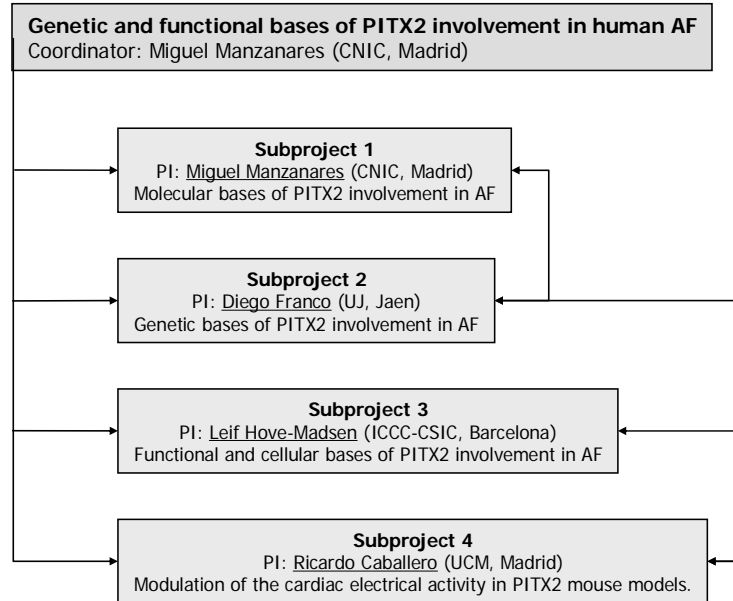
It should be stressed that only a small proportion of cases of AF will be directly linked to PITX2. However, the downstream components of the network regulated by this gene will surely be implicated at some degree. Therefore, by studying PITX2 and its targets, we will be able to better understand the nature of the phenotype underlying AF. In the same sense, animal and cell culture models with reduced PITX2 activity are not a straight and simple mouse model of human AF, but will surely show changes that are in common with AF patients. Genomic and cellular studies of both human AF samples and mouse models with reduced Pitx2 activity, already available at the consortium, will let us know the degree of similarity between both.

### General objectives

The global aim of this project is to get insights into the role of homeobox transcription Pitx2 as a candidate gene underlying the onset of atrial fibrillation in the human population. The global purpose of this project is therefore to get insights into the role of Pitx2 in atrial fibrillation, by combining genetic, molecular, electrophysiological, and computational approaches using both human samples as well as experimental models to test the hypotheses that, on the one hand, risk factor variants play a role in regulation the PITX2 expression in the heart and, on the other hand, that PITX2 controls a regulatory network that if impaired by lead to abnormal atrial electrical remodelling and/or cell-to-cell signalling causative of atrial fibrillation. For this, the present project puts together the previous expertise of different basic and clinically-oriented research groups to tackle the global understanding of PITX2 and its role in AF. Thus, this project is structured in **four subprojects** (Fig. 2); **subproject #1** will address the contribution of AF risk associated genetic variants to Pitx2 regulation as well as the regulatory networks driven by PITX2, characterising therein the cardiac-expressed genes regulated by PITX2 in the human heart; **subproject #2** will analyse the prevalence of PITX2 associated genetic variants, as well as the functional consequences of gain- and loss-of function of microRNA regulated by Pitx2; **subproject #3** will analyses the functional consequences of Pitx2 gain- and loss-of function in atrial cardiomyocytes regarding their electrophysiological properties and **subproject #4** will analyze the electrophysiological characteristics of two complementary haploinsufficient Pitx2 mouse models, the first one with a conditional deletion of Pitx2 in the atrial chambers and the second one within the ventricular chambers.

The **specific aims** of **subproject 1** are:

- 1.1) to analyze the regulatory functions of the genomic regions in the vicinity of Pitx2 associated with an increased risk for atrial fibrillation.
- 1.2) to generate a genome-wide map of regulatory elements bound by different isoforms of *Pitx2*, in both mouse and humans: we will test a subset of these for regulatory activity.
- 1.3) use this map together with expression profiles of healthy and diseased hearts in order to identify candidate genes regulated by *Pitx2* whose expression is affected in atrial fibrillation.



**Fig. 2: Organization and structure of the research consortium.** On the left are shown the initial interactions between the different subprojects, in terms of reagents and models.

The **specific aims of subproject 2** are:

- 2.1) to establish the allelic frequency of the genetic variants previously associated with AF in large cohorts of atrial fibrillation patients in the Spanish population.
- 2.2) to screen and identify novel genetic variants in the *Pitx2* gene within AF cohorts as compare to controls.
- 2.3) to screen and identify genetic variants on microRNAs controlled by *Pitx2*, or which might modulate *Pitx2* expression within the AF cohorts as compare to controls.
- 2.4) to establish the quantitative expression profiles of calcium, sodium and potassium channel encoding genes as well as key cell-to-cell gap junctional proteins in *Pitx2* gain- and loss-of-function systems.

The **specific aims of subproject 3** are:

- 3.1) establish how loss or gain of PITX2 function affects myocyte dimensions and/or connexin expression in human atrial myocytes isolated from patients with or without atrial dilation and/or atrial fibrillation.
- 3.2) elucidate how loss or gain of *Pitx2* function affects ion conductance, calcium dynamics, and beat-to-beat stability of human atrial myocytes isolated from patients with or without atrial dilation and/or atrial fibrillation.
- 3.3) investigate if loss or gain of *Pitx2* function promotes arrhythmogenic cell-cell signaling in cultured atrial myocytes.

The **specific aims of subproject 4** are:

- 4.1) to compare ECG parameters between atrial- and ventricular-specific *Pitx2* deficient mice at different ages, together with telemetry monitoring to record putative spontaneous arrhythmias in conscious mice.

4.2) to analyze the consequences of the *Pitx2* gene deletion in cardiac excitability, repolarization and refractoriness by recording APs in multicellular right and left atrial and right and left ventricular preparations from WT and atrial- and ventricular-specific *Pitx2* deficient mice.

4.3) identify the mechanism by which *Pitx2* modulates ion channels, particularly those with different distribution between LA and RA and/or on those whose conductance is relevant for the generation and maintenance of AF.

4.4) to determine the molecular mechanism responsible for the modulation by analyzing whether it involves direct binding of *Pitx2* of the channel promoter, or intermediate factors such as protein kinases or phosphatases.

## **Working plan**

### **Subproject #1**

The cloning of human DNA sequences containing AF risk associated genetic variants will be carried out during the first year and in vivo transgenesis will be developed during the second year. If no transgenic expression is obtained, new (wider) constructs will be cloned and tested by transgenesis during the second part of the second and third year and in vitro experiments will be carried out during the third year. As for the regulatory networks controlled by *Pitx2*, sample collection for chromatin immunoprecipitation and array analysis will be carried out during the first semester of the first year and ChIP and array experiments will be carried out during the second part of the first year. Bioinformatic analysis will be carried out during the second year and a map of the regulatory networks will be obtained at the third year.

### **Subproject #2**

Blood samples and their corresponding DNA preparation will be done during the first year. SNPs allele-specific PCR will be carried as soon as DNA samples are available, providing a mean to stratify AF patients within two categories (with/with risk-associated SNPs) throughout the full length of the project period. *PITX2* and microRNA sequencing will be performed during the second and third year, yielding to a full set of data by the end of the third year. Functional analysis of *Pitx2*-regulated microRNAs will be performed during the first year, and further complemented during the second and third year as data from the regulatory networks become available (subproject #1).

### **Subproject #3**

The effects of loss or gain of *PITX2* function on basic properties of human atrial myocytes such as cell size and morphology, connexin distribution, calcium transients, and cell shortening will be examined during the first year. Moreover, we shall, throughout the project, shall compile information on how loss or gain of *PITX2* function affects key calcium handling mechanisms in human atrial myocytes from patients with and without atrial fibrillation. In parallel, we shall first characterize the cellular and molecular bases for the generation of re-entrant calcium oscillations in cultured HL-1 myocytes. During the following two years, we shall investigate how loss or gain of *Pitx2* function affects this phenomenon and particularly the effects on cell-to-cell signaling and signal propagation.

### **Subproject #4**

Comparison of the ECG parameters (QRS, PR, and QT intervals, and heart rate) between atrial- and ventricular-specific *Pitx2* deficient mice with their respective WT controls will be performed during the first year, as well as the study of the consequences of the *Pitx2* gene deletion in

cardiac excitability, repolarization and refractoriness. In the second year, we will record ionic currents in atrial or ventricular myocytes enzymatically isolated from WT and atrial- or ventricular-specific Pitx2 knock-out mice by using the whole-cell patch-clamp. The expression of the ion channels (mRNA and proteins) by RT-PCR and Western-blotting will be also performed during this period. Finally, and during the last year of the project, we will address the direct or indirect involvement of Pitx2 in the regulation of ion channels, and the possible role of ANP.

### General Schedule

Objective	Task	Year1			Year2			Year3		
<b>1.1. Regulatory analysis of <i>PITX2</i></b>	Construct generation									
	In vivo and in vitro assays									
<b>1.2 ChIP-seq analysis of <i>PITX2</i> binding</b>	ChIP-seq									
	Bioinformatic analyses and regulatory networks									
<b>1.3. Genome-wide expression analysis</b>	Sample preparation									
	Microarray expression and bioinformatic analyses									
<b>2.1. Genetic screening <i>PITX2</i></b>	DNA sample collection									
	Genetic screening									
	Functional testing of microRNAs in HL-1									
<b>2.2. Pitx2 gain- and loss-of-function models</b>	Analyses of Pitx2 gain and loss-of-function models									
<b>2. 3. Gene expression analyses in AF and SR human atrial samples</b>	Tissue Sample collection									
<b>3.1. Clinical characterization of human atrial samples</b>										
<b>3.2. Effect of <i>PITX2</i> on myocyte properties</b>										
<b>3.3. Effect of <i>PITX2</i> on local calcium handling</b>	L-type calcium current amplitude									
	SR calcium uptake									
	SR calcium release									
<b>3.4. Effect of <i>PITX2</i> on cell-cell signalling</b>	Generation of re-entrant calcium oscillations									

	High-speed calcium imaging										
	Fast-scanning confocal microscopy										
<b>4.1. ECG recordings</b>	Anesthetized mice										
	Conscious mice (telemetric monitoring)										
<b>4.2. Action potential recordings</b>	Atrial-specific Pitx2 deficient mice										
	Ventricular-specific Pitx2 deficient mice										
<b>4.3. Regulation of ion channel expression by Pitx2</b>	Ion current recordings from freshly isolated cardiomyocytes										
	RT-PCR Western blotting										
<b>4.4. Molecular mechanism of the Pitx2 regulation</b>	Current recordings in cardiomyocytes in culture										

Date and signature of the Principal Investigator - Coordinator

## **Genética molecular de la fibrilación auricular; papel del factor de transcripción PITX2**

IP: Diego Franco Jaime, Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén

### ***Resumen***

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardíaca más común en pacientes humanos. No obstante, a pesar de su alta frecuencia, el conocimiento actual de las bases genéticas de la fibrilación auricular es bastante escaso. La presencia de mutaciones puntuales en canales de potasio ha sido asociada con fibrilación auricular familiar, aunque solo representan una fracción pequeña de todos los casos de FA. Recientemente se han identificado variantes génicas comunes en distintas regiones cromosómicas humanas que tiene una alta asociación (>30% en cada caso) con FA. Estas variantes de riesgo se localizan cerca de los factores de transcripción PITX2 y ZFHX3, del canal de potasio KCNN3 y del receptor IL6R, respectivamente. Además, un reciente estudio de meta-GWAS ha identificado seis nuevas variantes de riesgo. Nuestros trabajos recientes muestran que PITX2 está disminuido en biopsias cardíacas de pacientes de FA que han sido intervenidos quirúrgicamente en comparación con pacientes sin FA. Ello hace pensar que la falta de función de PITX2 pueda estar ligada a la presencia de FA. Nuestros estudios en modelos experimentales avalan esta hipótesis, demostrando que la falta de función de Pitx2 en las aurículas cardíacas conlleva a cambios morfológicos, moleculares y electrofisiológicos, mediados en parte por microRNAs, que alteran la función eléctrica del corazón y por ello son más propensos sufrir eventos de FA. En el presente proyecto queremos evaluar por un lado el valor predictivo de la presencia/ausencia de los distintos variantes de riesgo de AF, solos o por combinación, en una cohorte de pacientes con AF. A su vez, queremos analizar los posibles mecanismos sinérgicos de acción de las variantes de riesgo asociadas a PITX2 con las variantes asociadas a otros genes, tanto a nivel genético (epistasia) como a nivel de interacción molecular. Finalmente queremos analizar el papel regulador de Pitx2 en los mecanismos moleculares y rutas de señalización que promueven la fibrilación auricular.



## **1. Antecedentes y estado actual del tema**

La fibrilación auricular es la arritmia cardíaca más frecuente en la especie humana. Distintos estudios epidemiológicos han mostrado que la FA afecta al 1-2% de la población general y en mayores de 65 años, la frecuencia es tan elevada como el 8-10% (Zipes et al., 2005). Además, la FA está frecuentemente asociada a procesos de embolismo sistémico, incrementando por tanto la tasa de mortalidad y morbilidad en estos pacientes (Zipes et al., 2005). La fibrilación auricular se caracteriza por ser una arritmia cardíaca que se auto-estimula. De hecho, en la práctica clínica actual está comprobado que el éxito de la reversión de la FA aguda es inversamente proporcional a la duración de los periodos arritmogénicos previos y en consonancia con este paradigma los modelos experimentales han demostrado el concepto de domesticación de la FA en función de la duración del episodio arritmogénico. No obstante, a pesar de su alta frecuencia, el conocimiento actual de las bases genéticas de la fibrilación auricular es bastante escaso. La presencia de mutaciones puntuales en diversos canales de potasio ha sido asociada con fibrilación auricular familiar, aunque solo representan una fracción pequeña de todos los casos de FA (<10%). Recientes estudios de asociación genómica (GWAS) han identificado variantes génicas comunes de riesgo asociados FA en distintas cohortes de pacientes. Gudbjartsson et al (2007) demostró que variantes génicas en la región cromosómica 4q25 están asociadas altamente con FA, representando el 35% de los casos, y eran independientes de factores de riesgo de AF tales como la obesidad, la hipertensión y/o el infarto de miocardio. Las variantes génicas de riesgo están localizadas en un desierto génico y el gen más cercano se corresponde con el factor de transcripción PITX2. Por ello, estos autores sugirieron que alteración en la expresión y/o función de PITX2 podría ser la causa de la FA. Ello está sustentado en base al papel morfogenético de este factor de transcripción durante la cardiogénesis, y más concretamente en la formación de las venas pulmonares, región donde frecuente se generan focos arritmogénicos. Por otro lado, Ellinor et al. (2010) han demostrado que variantes génicas en la región cromosómica 1q21, y en concreto en un intrón del gen KCNN3 muestra una alta asociación con FA. De modo semejante, Gudbjartsson et al (2009) han demostrado asociación en variantes génicas localizadas en el factor de transcripción ZFX3 (región cromosómica 16q22) y FA. Más recientemente Schnabel et al. (2011) ha demostrado una asociación entre variantes próximos a IL6R y AF. Además, un meta-análisis de GWAS ha identificado seis nuevos variantes asociados a AF (Ellinor et al., 2012). La asociación entre dichas variantes génicas y la presencia de FA no muestran asociación con edad, sexo, diabetes o hipertensión, si bien las variantes asociadas a ZFX3 si lo hacen con cardioembolismo isquémico (Gudbjartsson et al. 2009). Curiosamente, con la excepción de la posible implicación morfogenética de PITX2 en AF, en el caso del resto de los genes asociados con AF, su posible

vinculación funcional esta poco esclarecida. Por ejemplo, el papel de KCNN3 en electrofisiología cardíaca es controvertido, quizás por estar pobremente caracterizado y del mismo modo, el papel de ZFH3 en el corazón tampoco está caracterizado. Nuestros trabajos previos en este contexto han corroborado la asociación de las variantes génicas 4q25 en una pequeña cohorte española de pacientes con FA (Chinchilla et al., 2011). Además hemos demostrado que existe una disminución en los niveles de expresión de PITX2 en las aurículas de pacientes con FA, sugiriendo que la falta de función de PITX2 puede ser la causante de la FA en estos pacientes (Chinchilla et al. 2011). Esta hipótesis está avalada por nuestros datos experimentales en los que mostramos que la falta de función selectiva de Pitx2 en las aurículas de ratón conlleva a cambios estructurales, molecular y electrofisiológicos que promueven una mayor susceptibilidad a sufrir procesos arritmogénicos auriculares (Chinchilla et al., 2011), en consonancia con los estudios similares realizados por otros grupos de investigación (Wang et al., 2010; Kirchhof et al., 2011). En concreto, la falta de función de Pitx2 promueve un incremento en la tasa de proliferación en las cámaras auriculares y por ende incrementa su tamaño, además de modular la expresión de diversos canales iónicos. Dicha regulación se produce en parte mediante la modulación de la expresión de microRNAs.

Sin embargo, actualmente se desconoce si las variantes génicas asociadas con FA tienen un valor predictivo, y si en el caso de que lo tuviesen, este incrementa a medida que un mayor número de estas variantes génicas es analizada. Del mismo modo, se desconoce si existe una interrelación molecular entre los distintos genes asociados a FA, es decir PITX2, KCNN3, ZFH3, IL6R, y/o los genes asociados en el meta-análisis GWAS (PRRX1, WNT8A, CAV1, SYNPO2L, SYNE2, HCN4) o si comparten las mismas vías de señalización. En este contexto, es de destacar que Hcn4 está regulado por Pitx2 (Wang et al., 2011). Finalmente, sería muy interesante explorar qué papel tiene Pitx2 en la regulación de vías de señalización previamente asociadas con la AF, tales como fibrosis, inflamación, dilatación atrial y/o homeostasis del calcio intracelular, para identificar vías de señalización comunes cuya modulación pueda estar mediada por microRNAs, y con ello puedan abrir nuevas estrategias terapéuticas para tratar la FA.

## Referencias

- Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Cinca J, Hove-Madsen L, Aranega AE, Franco D. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4: 269-79.
- Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, Ritchie MD, Smith AV, Arking DE, Müller-Nurasyid M, Krijthe BP, Lubitz SA, Bis JC, Chung MK, Dörr M, Ozaki K, Roberts JD, Smith JG, Pfeufer A, Sinner MF, Lohman K, Ding J, Smith NL, Smith JD, Rienstra M, Rice KM, Van Wagoner DR, Magnani JW, Wakili R, Clauss S, Rotter JI, Steinbeck G, Launer LJ, Davies RW, Borkovich M, Harris TB, Lin H, Völker U, Völzke H, Milan DJ, Hofman A, Boerwinkle E, Chen LY, Soliman EZ, Voight BF, Li G, Chakravarti A, Kubo M, Tedrow UB, Rose LM, Ridker PM, Conen D, Tsunoda T, Furukawa T, Sotoodehnia N, Xu S, Kamatani N, Levy D, Nakamura Y, Parvez B, Mahida S, Furie KL, Rosand R,

- Muhammad R, Psaty BM, Meitinger T, Perz S, Wichmann HE, Witteman JC, Kao WH, Kathiresan S, Roden DM, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, McKnight B, Sjögren M, Newman AB, Liu Y, Gollob MH, Melander O, Tanaka T, Stricker BH, Felix SB, Alonso A, Darbar D, Barnard J, Chasman DI, Heckbert SR, Benjamin EJ, Gudnason V, Kääb S. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat Genet* 2012; 44: 670-5.
- Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, Sinner MF, de Bakker PI, Mueller M, Lubitz SA, Fox E, Darbar D, Smith NL, Smith JD, Schnabel RB, Soliman EZ, Rice KM, Van Wagoner DR, Beckmann BM, van Noord C, Wang K, Ehret GB, Rotter JI, Hazen SL, Steinbeck G, Smith AV, Launer LJ, Harris TB, Makino S, Nelis M, Milan DJ, Perz S, Esko T, Köttgen A, Moebus S, Newton-Cheh C, Li M, Möhlenkamp S, Wang TJ, Kao WH, Vasan RS, Nöthen MM, MacRae CA, Stricker BH, Hofman A, Uitterlinden AG, Levy D, Boerwinkle E, Metspalu A, Topol EJ, Chakravarti A, Gudnason V, Psaty BM, Roden DM, Meitinger T, Wichmann HE, Witteman JC, Barnard J, Arking DE, Benjamin EJ, Heckbert SR, Kääb S. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):240-4.
- Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Pálsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdóttir E, Helgason A, Sigurjonsdóttir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature* 2007; 448: 353-7.
- Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdóttir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G, Gulcher J, Mathiesen EB, Njølstad I, Nyrnes A, Wilsgaard T, Hald EM, Hveem K, Stoltenberg C, Kucera G, Stubblefield T, Carter S, Roden D, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Gieger C, Wichmann HE, Gschwendtner A, Dichgans M, Kühlenbäumer G, Berger K, Ringelstein EB, Bevan S, Markus HS, Kostulas K, Hillert J, Sveinbjörnsdóttir S, Valdimarsson EM, Løchen ML, Ma RC, Darbar D, Kong A, Arnar DO, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet*. 2009 Aug;41(8):876-8.
- Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, Rotering H, Fortmueller L, Laakmann S, Verheule S, Schotten U, Fabritz L, Brown NA. PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4: 123-33.
- Schnabel RB, Kerr KF, Lubitz SA, Alkylbekova EL, Marcus GM, Sinner MF, Magnani JW, Wolf PA, Deo R, Lloyd-Jones DM, Lunetta KL, Mehra R, Levy D, Fox ER, Arking DE, Mosley TH, Müller-Nurasyid M, Young TR, Wichmann HE, Seshadri S, Farlow DN, Rotter JI, Soliman EZ, Glazer NL, Wilson JG, Breteler MM, Sotoodehnia N, Newton-Cheh C, Kääb S, Ellinor PT, Alonso A, Benjamin EJ, Heckbert SR; Candidate Gene Association Resource (CARE) Atrial Fibrillation/Electrocardiography Working Group. Large-scale candidate gene analysis in whites and African Americans identifies IL6R polymorphism in relation to atrial fibrillation: the National Heart, Lung, and Blood Institute's Candidate Gene Association Resource (CARE) project. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011 Oct;4(5):557-64.
- Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 9753-8.
- Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine. Elsevier Saunders, 2005 (7<sup>th</sup> edition). Filadelfia. EEUU.

## **2. Hipótesis de trabajo y objetivos del proyecto**

Los estudios recientes de análisis genómico de asociación (GWAS) en fibrilación auricular han permitido incrementar nuestro conocimiento sobre las posibles bases genético-moleculares de la fibrilación auricular. En este contexto, se ha evidenciado que las variantes de riesgo asociadas al factor de transcripción PITX2 son las que muestran mayor significancia estadística. Sin embargo se desconoce si la asociación de estas variantes de riesgo (PITX2) en combinación con otras recientemente descritas (ver revisión de [Sinner et al., 2013](#)) incrementa el valor predictivo a padecer fibrilación auricular. Dado que PITX2 es el gen con mayor significancia estadística en estos estudios de GWAS de AF, es posible que exista una interrelación molecular con los distintos genes asociados a FA, es decir KCNN3, ZFHX3, IL6R, y/o los genes asociados en el meta-análisis GWAS (PRRX1, WNT8A, CAV1, SYNPO2L, SYNE2, HCN4). Finalmente, si bien se ha establecido que la falta de función de Pitx2 en modelos de ratón modificados

genéticamente incrementan la vulnerabilidad a sufrir procesos arritmogénicos y que distintas vías de distintas vías de señalización están alteradas (Wang et al., 2010; Kirchoff et al., 2011; Chinchilla et al., 2011), no se conoce si Pitx2 también puede alterar vías de señalización previamente asociadas con la AF, tales como fibrosis, inflamación, dilatación atrial y/o homeostasis del calcio intracelular. Nuestra hipótesis de trabajo es, por un lado que asociación o concurrencia de múltiple variantes de riesgo asociadas a AF tiene un alto valor predictivo y por otro lado que PITX2 controla múltiples vías de señalización cuya disfunción provoca el inicio de procesos arritmogénicos auriculares en el corazón.

Por ello, y en base a los planteamientos anteriormente expuestos, en el presente proyecto proponemos los siguientes **objetivos**:

- 1) Genotipado de las variantes génicas asociadas con FA, en una cohorte de pacientes con FA y estudio predictivo de dichas variantes.
- 2) Estudio de la interacción molecular entre Pitx2 y los genes asociados con AF mediante análisis de GWAS
- 3) Análisis de papel regulador de Pitx2 en las rutas de señalización asociadas a FA.

### **3. Material y métodos**

#### ***Genotipado de las variantes génicas de las regiones cromosómicas asociadas con FA, en una cohorte de pacientes con FA***

En este objetivo queremos analizar la prevalencia, distribución y asociación acumulativa de las variantes génicas asociadas con AF mediante análisis de GWAS, incluyendo por tanto variantes asociadas a PITX2 (chr 4), KCNN3 (chr 1), ZFHX3 (chr 16), IL6R (chr 1), PRRX1 (chr 1), WNT8A (chr 5), CAV1 (chr 7), SYNPO2L (chr 10), SYNE2 (chr 14) y HCN4 (chr 15), en una cohorte de pacientes con FA, respecto a una cohorte control. En colaboración con el Hospital Universitario “Ciudad de Jaén” hemos iniciado esta colaboración en el contexto de un proyecto previo financiado por la Fundación CNIC (CNIC-T 08/2009), el cual cuenta con la valoración positiva del comité de Bioética del Hospital “Ciudad de Jaén” y de la Universidad de Jaén, respectivamente. En la actualidad tenemos ya un total de 30 pacientes identificados y cuyas muestras de sangre, tras obtener el consentimiento informado para cada uno de ellos, ha sido procesada para el aislamiento y purificación de ADN genómico. Mediante el desarrollo de este proyecto esperamos conseguir incrementar hasta 100 el número de pacientes de AF durante el primer año y medio de ejecución del proyecto. La obtención de muestras de individuos controles se obtendrán del Banco Nacional de ADN (Salamanca). El genotipado incluirá los

siguientes SNPs (*chr4 PITX2*; rs2200733, rs13143308, rs6843082, 10033464, rs3853445, *chr1 KCNN3, IL6R*; rs1051614, rs13376333, rs4845625, *chr16 ZFHX3*; rs7193343, rs2106261, rs74913256; *chr5 WNT8A* rs2040862, *chr7 CAV1* rs3807989, *chr15 HCN4*, rs7164883; *chr1 PRRX1* rs3903239, *chr10 SYNPO2L* rs10824026, *chr14 SYNE2* rs1152591. Durante el tercer trimestre del primer año, se iniciará el envío de las muestras control y las de pacientes AF al Centro Nacional de Genotipado en Santiago de Compostela para su análisis molecular. Dada nuestra experiencia previa con esta plataforma tecnológica, esperamos que los resultados estén listo en aproximadamente 1-2 meses desde su envío, de tal forma que podamos iniciar el análisis bioinformático de frecuencias y distribución alélicas (cada SNPs por separados), haplotipos (asociación de distintos SNPs), segregación acumulativa de variantes de riesgo y análisis epistático a partir del segundo trimestre del segundo año. Ello nos permitirá saber cuál es el grado de solapamiento de los distintos SNPs en pacientes con AF, y determinar de este modo el valor predictivo y el factor de riesgo a nivel de paciente individual.

#### ***Estudio del papel regulador de Pitx2 en genes GWAS asociados a AF***

En la actualidad, se ha realizado estudios GWAS que permiten vincular variantes génicas asociadas a PITX2, KCNN3, ZFHX3, IL6R con FA ([Gudbjartsson et al., 2007, 2009](#); [Benjamin et al. 2009](#); [Damani et al., 2009](#); [Ellinor et al., 2010](#); [Schnabel et al. 2011](#)). Además un meta-análisis de GWAS ha identificado seis nuevas variantes génicas (PRRX1, WNT8A, CAV1, SYNPO2L, SYNE2, HCN4) asociadas a AF ([Ellinor et al., 2012](#)). En el caso de PITX2, se ha visto que existe una disminución en la expresión de este factor de transcripción en pacientes con FA, y que la falta de función de Pitx2 en ratones modificados genéticamente predispone a procesos arritmogénicos auriculares ([Wang et al., 2010](#); [Kirchhof et al., 2011](#); [Chinchilla et al., 2011](#)). El análisis molecular de estos mutantes ha establecido que Pitx2 regula a Shox2 y por tanto a su vez al canal iónico Hcn4, mientras que por otro lado, la regulación de miR-1 modula la expresión de distintos canales iónicos de potasio, contribuyendo con ello a la predisposición a experimentar eventos arrítmicos. Por el contrario, no se ha observado mutaciones puntuales en los genes PITX2 y/o KCNN3 asociadas a FA ([Boldt et al. 2010](#); [Olesen et al., 2011](#)). Sin embargo, no se conoce si existe una interrelación molecular entre Pitx2 y los distintos genes asociados a FA mediante análisis de GWAS. Por ello, en este objetivo nos planteamos dilucidar cuál es la jerarquía molecular entre Pitx2 y los distintos genes asociados a AF, es decir Kcnn3, Zfhx3, Il6r, Prrx1, Wnt8a, Cav1, Synpo2l y Syne2. En nuestro laboratorio del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén disponemos de modelos experimentales *in vitro* de falta y ganancia de función para Pitx2, así como modelos *in vivo* de pérdida de función selectiva de Pitx2 en las cámaras atriales o ventriculares, respectivamente. Así mismo, hemos

desarrollado modelos *in vitro* de ganancia y pérdida de función para Zfhx3, en colaboración con el Dr. Miura (Nagoya, Japón) y estamos realizando la misma aproximación para los otros genes. Ellos nos permitirá explorar si, por ejemplo, Kcnn3 y/o Zfhx3 están alterados por la pérdida o ganancia de función de Pitx2, o viceversa. En este contexto, tenemos datos preliminares usando nuestro modelos de falta de función de Pitx2 *in vitro* que demuestran una modulación de Kcnn3, Zfhx3 y Il6r dirigida por Pitx2. Por ello, en este objetivo, vamos a corroborar estos datos *in vivo* y además vamos a realizar ensayos de pérdida o ganancia de función de los distintos factores de transcripción (Pitx2, Zfhx3 y Prrx1, respectivamente) y pérdida de función mediante siRNA de los genes que codifican para proteínas estructurales y/o de señalización (Kcnn3, Il6r, Wnt8a, Cav1, Synpo2l y Syne2, respectivamente), en tres modelos de cultivos celulares distintos, a) mioblastos esqueléticos (Sol8), b) cardiomioblastos (HL-1) y c) cultivos primarios de cardiomiocitos ventriculares. Realizaremos transfecciones transitorias con los correspondientes plásmidos (sobre-expresión) o oligo (siRNA; inhibición) y posteriormente analizaremos mediante qRT-PCR los niveles relativos de expresión. Ello nos permitirá establecer la jerarquía molecular entre estos genes y Pitx2 que, junto con los resultados obtenidos en el objetivo 1), permitirán establecer fidedignamente el grado de implicación de cada uno de estos genes candidatos en la fisiopatología cardíaca subyacente a la fibrilación auricular.

#### ***Papel regulador de Pitx2 en vías de señalización asociadas a FA.***

Recientemente hemos demostrado que Pitx2 modula la expresión del microRNA miR-1, y de este modo, regula la expresión y función de Kcnj2 (Kir2.1) y Gja1 (Cx43) (Chinchilla et al., 2011). Dado que Pitx2 también juega un papel determinante en la modulación de otros canales iónicos, tales como Scn5a, Scn1b y Gja5 (Cx40) (Chinchilla et al., 2011; Lozano-Velasco et al., 2011), es posible que otros microRNAs puedan ejercer funciones análogas al miR-1. Por ello, en este objetivo nos planteamos realizar estudios de expresión génica de microRNAs mediante microarrays en nuestro modelo condicional de pérdida de función de Pitx2 en el miocardio auricular con el objetivo de identificar posibles microRNAs regulados por Pitx2 que modulen la expresión de canales iónicos y por ende, puedan jugar un papel determinante en la generación de procesos arritmogénicos. El análisis de microarrays de microRNAs será realizado por la empresa Bioarrays (Alicante), de modo semejante a otras aproximaciones experimentales que nuestro grupo ha realizado con anterioridad. Ello nos permitirá identificar un conjunto de microRNAs regulados por Pitx2, de forma semejante al realizado por nuestro grupo en células mioblasticas esqueléticas (E Lozano-Velasco, Tesis Doctoral 2011). Los microRNAs identificados serán comparados con los microRNA identificados por Xiao et al.

(2011), permitiendo así centrarnos en aquellos microRNAs que están regulados por Pitx2 y que además están desregulados en pacientes con FA. Posteriormente, analizaremos el papel regulador que tienen estos microRNAs en la expresión de los distintos canales iónicos mediante ensayos de transfección en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales con pre-miR (agonistas) y anti-miR (inhibidores) de dichos microRNAs, usando la misma aproximación metodológico realizada por nuestro grupo con anterioridad (Chinchilla et al., 2010). Esta estrategia nos dará la posibilidad de testar su contribución en modelos animales con mayor susceptibilidad de sufrir procesos arritmogénicos, permitiendo de este modo explorar su posible uso terapéutico en el contexto de la fibrilación auricular.

#### 4. Cronograma del plan de trabajo

Plan de trabajo	Primer año												Segundo año												Investigadores													
Obtención de muestras sanguíneas humanas																									Eduardo Vazquez Cristobal Lozano Antonio Linde													
Procesamiento y Genotipado de variantes génicas																									Diego Franco Jorge Domínguez Técnico solicitado													
Análisis bioinformático variantes génicas																									Diego Franco Jorge Domínguez													
Análisis del papel regulador de Pitx2; modelos <i>in vitro</i>																									Diego Franco Amelia Aranega													
Análisis del papel regulador de Pitx2; modelos <i>in vivo</i>																									Amelia Aranega Técnico solicitado													
Análisis de la regulación de vías de señalización de AF																									Diego Franco Amelia Aranega Jorge Domínguez													

#### 5. Medios disponibles

El grupo de Investigación Cardiovascular de la Universidad de Jaén dispone de un laboratorio general de Biología Celular y Molecular en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén. Este laboratorio posee el equipamiento necesario para llevar a cabo técnicas rutinarias en el campo de la Biología Celular y Molecular, tales como termocicladores, PCR en tiempo real, estufas para cultivos bacterianos, horno de hibridación, lupas, microscopía óptica y de fluorescencia, electrocardiógrafo para ratón, baños de incubación microtomos de parafina, autoclaves, criostato, etc. Además de este laboratorio general, el grupo de Investigación Cardiovascular también cuenta con un laboratorio de cultivos celulares, provisto de cámaras de flujo laminar, estufas de cultivo, microscopio invertido, incubadoras de CO<sub>2</sub> y equipo para transfección de células eucariotas.

El Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén, dispone además de instalaciones comunes para todos los grupos de investigación. Estas instalaciones cuentan con una cámara frigorífica, un cámara oscura para revelado fotográfico, un sonicador, una dependencia para PCR y una dependencia para procesamiento de geles de ácidos nucleicos (sistema de captura de imágenes y transiluminador) con campanas de flujo laminar,

centrífugas y microcentrífugas, incubadores, autoclaves y estufa de secado de material de vidrio.

Además de estos equipamientos, la Universidad de Jaén, a través del Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT), también proporciona apoyo a la investigación desarrollada por los distintos grupos de investigación de esta Universidad. El Grupo de Investigación Cardiovascular trabaja en estos momentos con varios modelos de ratón transgénicos, los cuales están emplazados en las instalaciones del Centro de Producción y Experimentación Animal (CPEA) del CICT. En base a esto, no se requiera ningún material inventariable para la realización de este proyecto de investigación.

## **6. Materiales requeridos para la ejecución del proyecto**

Para la realización de este proyecto de investigación necesitaremos material fungible, principalmente para la realización del genotipado de las distintas variantes génicas (externalizado al Centro Nacional de Genotipado), reactivos de biología molecular, principalmente para qPCR, sondas de pre-miRs y anti-miRs, así como reactivos y medios de cultivos celulares. La realización de los análisis de microarrays serán externalizados en la empresa biotecnológica Bioarrays (Alicante). Sin embargo no necesitaremos material inventariable puesto que nuestro grupo de investigación cuenta en la actualidad con los medios y equipos necesarios para poder llevar a cabo las investigaciones propuestas.

En el contexto de personal, necesitaremos la contratación de un técnico especialista de laboratorio, durante un tiempo aproximado de 6-8 meses, para poder llevar a cabo la recepción, aislamiento, cuantificación y control de calidad de las muestras de ADN obtenidas a partir de las muestras de sangre de los pacientes AF.

## **7. Memoria económica**

### Gastos de personal

Técnico especialista de laboratorio	15000 €
-------------------------------------	---------

### Gastos de ejecución

#### Material fungible

Secuenciación de variantes génicas	2500€
Reactivos de biología molecular	3000€
Reactivos y medios de cultivos celulares	2500 €
Sondas de pre-miR y anti-miR	1500€
Análisis de microarrays (microRNAs)	<u>3000€</u>
	12500€

Viajes, dietas e inscripciones a congreso

Asistencia a congresos internacionales 2500€



	2500€
SUBTOTAL	15000€
TOTAL	30000€

## **8. Plan de difusión**

Recientemente, se ha mostrado que el factor de transcripción Pitx2 puede tener un papel relevante en cardiopatías arritmogénicas tan frecuentes como la fibrilación atrial. La aplicación de genotipado en cohorte de pacientes con AF permitirá dilucidar el papel predictivo de dichas variantes génicas. Además, las técnicas de cuantificación mediante qPCR de distintos genes asociados con la AF en nuestros modelos de pérdida y ganancia de función de *Pitx2* nos proporcionan una base sólida para poder dilucidar en detalle cual es el papel de este factor de transcripción en la génesis de la fibrilación auricular, así como cuales son las cascadas moleculares que dirigen. En resumen, la realización de este proyecto puede aportar datos que resuelvan aspectos importantes de la base genético molecular de la fibrilación auricular. Además, la puesta en marcha de este proyecto supone la consolidación de esta línea de investigación ya iniciada en nuestro grupo y que ha aportado resultados a nivel internacional, como se puede derivar de las recientes invitaciones de distintas sociedades de investigación (European Society of Cardiology, American Heart Association, Heart Rhythm Society) como ponente invitado a sus congresos durante el último año.

Los resultados de este proyecto serán difundidos mediante presentaciones a Congresos de ámbito nacional e internacional en los que, de forma habitual, viene participando nuestro grupo de investigación (Weinstein Cardiovascular Development Conference, Keystone Symposia, European Society of Cardiology, American Heart Association Scientific Sessions, Heart Rhythm Society Scientific Sessions, Congresos Nacionales de la Sociedad Española de Cardiología, de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, etc...). Así mismo, la difusión de los resultados se realizará mediante su publicación en artículos en revistas internacionales con revisión de un panel de expertos en el área ("peer-review") y con alto índice de impacto (p.ej. *Cardiovascular Research*, *Circulation: Cardiovascular Genetics*; *Circulation Research*, *PloS One* etc). La experiencia de nuestro grupo de investigación y las colaboraciones establecidas, a nivel internacional, con otros grupos de investigación, facilitan la difusión y divulgación de los resultados.

Además de los aspectos de difusión científica de los resultados de la experimentación propuesta en este proyecto, el estudio de los mecanismos de acción de distintos microRNAs en el contexto de la fibrilación auricular pueden resultar en aplicaciones novedosas con

proyeccion terapeutica que puedan ser objeto de proteccion mediante patentes, como ya hemos realizado recientemente en nuestro laboratorio.

## Referencias

- Benjamin EJ, Rice KM, Arking DE, Pfeufer A, van Noord C, Smith AV, Schnabel RB, Bis JC, Boerwinkle E, Sinner MF, Dehghan A, Lubitz SA, D'Agostino RB Sr, Lumley T, Ehret GB, Heeringa J, Aspelund T, Newton-Cheh C, Larson MG, Marciante KD, Soliman EZ, Rivadeneira F, Wang TJ, Eiríksdóttir G, Levy D, Psaty BM, Li M, Chamberlain AM, Hofman A, Vasan RS, Harris TB, Rotter JI, Kao WH, Agarwal SK, Stricker BH, Wang K, Launer LJ, Smith NL, Chakravarti A, Uitterlinden AG, Wolf PA, Sotoodehnia N, Köttgen A, van Duijn CM, Meitinger T, Mueller M, Perz S, Steinbeck G, Wichmann HE, Lunetta KL, Heckbert SR, Gudnason V, Alonso A, Kääb S, Ellinor PT, Witteman JC. Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):879-81. Epub 2009 Jul 13. PubMed PMID: 19597492; PubMed Central PMCID: PMC2761746.
- Boldt LH, Posch MG, Perrot A, Polotzki M, Rolf S, Parwani AS, Huemer M, Wutzler A, Ozelik C, Haverkamp W. Mutational analysis of the PITX2 and NKX2-5 genes in patients with idiopathic atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2010 Nov 19;145(2):316-7. PubMed PMID: 20022124.
- Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Cinca J, Hove-Madsen L, Aranega AE, Franco D. PITX2 Insufficiency Leads to Atrial Electrical and Structural Remodeling Linked to Arrhythmogenesis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Apr 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21511879.
- Chinchilla A, Lozano E, Daimi H, Esteban FJ, Crist C, Aranega AE, Franco D. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovasc Res.* 2011 Jan 1;89(1):98-108.
- Damani SB, Topol EJ. Molecular genetics of atrial fibrillation. *Genome Med.* 2009 May 22;1(5):54. PubMed PMID: 19490585; PubMed Central PMCID: PMC2689446.
- Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, Ritchie MD, Smith AV, Arking DE, Müller-Nurasyid M, Krijthe BP, Lubitz SA, Bis JC, Chung MK, Dörr M, Ozaki K, Roberts JD, Smith JG, Pfeufer A, Sinner MF, Lohman K, Ding J, Smith NL, Smith JD, Rienstra M, Rice KM, Van Wagoner DR, Magnani JW, Wakili R, Clauss S, Rotter JI, Steinbeck G, Launer LJ, Davies RW, Borkovich M, Harris TB, Lin H, Völker U, Völzke H, Milan DJ, Hofman A, Boerwinkle E, Chen LY, Soliman EZ, Voight BF, Li G, Chakravarti A, Kubo M, Tedrow UB, Rose LM, Ridker PM, Conen D, Tsunoda T, Furukawa T, Sotoodehnia N, Xu S, Kamatani N, Levy D, Nakamura Y, Parvez B, Mahida S, Furie KL, Rosand J, Muhammad R, Psaty BM, Meitinger T, Perz S, Wichmann HE, Witteman JC, Kao WH, Kathiresan S, Roden DM, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, McKnight B, Sjögren M, Newman AB, Liu Y, Gollob MH, Melander O, Tanaka T, Stricker BH, Felix SB, Alonso A, Darbar D, Barnard J, Chasman DI, Heckbert SR, Benjamin EJ, Gudnason V, Kääb S. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation.
- Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, Sinner MF, de Bakker PI, Mueller M, Lubitz SA, Fox E, Darbar D, Smith NL, Smith JD, Schnabel RB, Soliman EZ, Rice KM, Van Wagoner DR, Beckmann BM, van Noord C, Wang K, Ehret GB, Rotter JI, Hazen SL, Steinbeck G, Smith AV, Launer LJ, Harris TB, Makino S, Nelis M, Milan DJ, Perz S, Esko T, Köttgen A, Moebus S, Newton-Cheh C, Li M, Möhlenkamp S, Wang TJ, Kao WH, Vasan RS, Nöthen MM, MacRae CA, Stricker BH, Hofman A, Uitterlinden AG, Levy D, Boerwinkle E, Metspalu A, Topol EJ, Chakravarti A, Gudnason V, Psaty BM, Roden DM, Meitinger T, Wichmann HE, Witteman JC, Barnard J, Arking DE, Benjamin EJ, Heckbert SR, Kääb S. Common variants in KCNN3 are

- associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet.* 2010 Mar;42(3):240-4. Epub 2010 Feb 21. PubMed PMID: 20173747; PubMed Central PMCID: PMC2871387.
- Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Pálsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdóttir E, Helgason A, Sigurjonsdóttir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature.* 2007 Jul 19;448(7151):353-7. Epub 2007 Jul 1. PubMed PMID: 17603472.
- Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdóttir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G, Gulcher J, Mathiesen EB, Njølstad I, Nyrnes A, Wilsgaard T, Hald EM, Hveem K, Stoltenberg C, Kucera G, Stubblefield T, Carter S, Roden D, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Gieger C, Wichmann HE, Gschwendtner A, Dichgans M, Kühlenbäumer G, Berger K, Ringelstein EB, Bevan S, Markus HS, Kostulas K, Hillert J, Sveinbjörnsdóttir S, Valdimarsson EM, Løchen ML, Ma RC, Darbar D, Kong A, Arnar DO, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. A sequence variant in ZFX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):876-8. Epub 2009 Jul 13. PubMed PMID: 19597491; PubMed Central PMCID: PMC2740741.
- Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, Roterberg H, Fortmueller L, Laakmann S, Verheule S, Schotten U, Fabritz L, Brown NA. PITX2c Is Expressed in the Adult Left Atrium, and Reducing Pitx2c Expression Promotes Atrial Fibrillation Inducibility and Complex Changes in Gene Expression. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Apr 1;4(2):123-33. Epub 2011 Jan 31. PubMed PMID:21282332.
- Lozano-Velasco E, Chinchilla A, Martínez-Fernández S, Hernández-Torres F, Navarro F, Lyons GE, Franco D, Aránega AE. Pitx2c modulates cardiac-specific transcription factors networks in differentiating cardiomyocytes from murine embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 2011; 194: 49-62.
- Olesen MS, Jabbari J, Holst AG, Nielsen JB, Steinbrüchel DA, Jespersen T, Haunsø S, Svendsen JH. Screening of KCNN3 in patients with early-onset lone atrial fibrillation. *Europace.* 2011 Mar 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID:21398315.
- Schnabel RB, Kerr KF, Lubitz SA, Alkylbekova EL, Marcus GM, Sinner MF, Magnani JW, Wolf PA, Deo R, Lloyd-Jones DM, Lunetta KL, Mehra R, Levy D, Fox ER, Arking DE, Mosley TH, Müller-Nurasyid M, Young TR, Wichmann HE, Seshadri S, Farlow DN, Rotter JI, Soliman EZ, Glazer NL, Wilson JG, Breteler MM, Sotoodehnia N, Newton-Cheh C, Kääb S, Ellinor PT, Alonso A, Benjamin EJ, Heckbert SR; Candidate Gene Association Resource (CARE) Atrial Fibrillation/Electrocardiography Working Group. Large-scale candidate gene analysis in whites and African Americans identifies IL6R polymorphism in relation to atrial fibrillation: the National Heart, Lung, and Blood Institute's Candidate Gene Association Resource (CARE) project. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Oct;4(5):557-64.
- Sinner MF, Ellinor PT, Meitinger T, Benjamin EJ, Kääb S. Genome-wide association studies of atrial fibrillation: past, present, and future. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 701-9.
- Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 25;107(21):9753-8. Epub 2010 May 10. PubMed PMID: 20457925; PubMed Central PMCID: PMC2906838.
- Xiao J, Liang D, Zhang Y, Liu Y, Zhang H, Liu Y, Li L, Liang X, Sun Y, Chen YH. MicroRNA expression signature in atrial fibrillation with mitral stenosis. *Physiol Genomics.* 2011 Jun 15;43(11):655-64.

## 9. Solicitud de informe de Bioética

## COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN

### **SOLICITUD DE INFORME DE PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **1. DATOS DEL INVESTIGADOR SOLICITANTE Y PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Investigador/a Principal o Responsable:**

Apellidos:	FRANCO JAIME		Nombre:	DIEGO
Dpto.:	Biología Experimental	Centro/Facultad:	Ciencias Experimentales	
Dirección:	Facultad de Ciencias Experimentales			
Teléfono:	82763	Fax.:	953 211875	E-mail: dfranco@ujaen.es

Título Proyecto de investigación:	Genetica molecular de la fibrilacion auricular: papel de factor de transcripcion PITX2		
Convocatoria *:	UJA Biomedicina	Año:	2013
Título Procedimiento (s)			

(\*) En el que están incluidos los procedimientos para los que se solicita informe CICYT, FIS, JA, Plan Propio, etc.

#### **2. SUPUESTO(S) DEL ART. 15 DEL RD1201/2005 EN LOS QUE SE INCLUYEN EL/LOS PROCEDIMIENTO (S) EXPERIMENTALES PROPUESTO(S)**

**1. Utilización de las especies incluidas en el anexo VII del RD 1201/2005 que no hayan nacido o sido criadas en centros oficialmente reconocidos:**

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

**Proveedor de los animales (nombre, apellidos, razón social) :**

--

**2. Utilización de: (i) animales salvajes capturados en la naturaleza, (ii) animales vagabundos, (iii) animales procedentes de centros de protección animal oficiales, y (iv) animales protegidos o en peligro de extinción \***

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

**Indicar especie (s) y en su caso, código CITES al que pertenece:**

(\*) Para el grupo IV, sólo se autoriza si lo permite la normativa específica de protección y siempre que los objetivos del procedimiento sea la investigación para la protección de estas especies y otros fines biomédicos esenciales no realizables con otras especies.

3. ¿Se ejecutan total o parcialmente los procedimientos fuera de los centros registrados?:

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

4. ¿Se contempla la liberación de los animales durante el procedimiento experimental?:

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

5. ¿Al finalizar el procedimiento con animales capturados en la naturaleza, se devuelven a su medio original?

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

6. ¿Está previsto que el procedimiento provoque en el animal un dolor grave y prolongado?

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

7. ¿Está prevista el uso de animales previamente sometidos a otro procedimiento experimental?:

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input checked="" type="checkbox"/>

### 3. OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO DE EXPERIMENTACIÓN

*Describir y desglosar los objetivos que se pretenden alcanzar con este procedimiento experimental*

#### Objetivos:

- 1) Genotipado de las variantes génicas asociadas con FA, en una cohorte de pacientes con FA y estudio predictivo de dichas variantes.
- 2) Estudio de la interacción molecular entre Pitx2 y los genes asociados con AF mediante análisis de GWAS
- 3) Análisis de panel regulador de Pitx2 en las rutas de señalización asociadas a FA

### 4. DISEÑO Y METODOLOGÍA

*Indicar las diferentes metodologías que contempla el procedimiento experimental, detallando para cada una de las fases, la duración el tipo y número de animales utilizados y las manipulaciones a las que serán*

#### Descripción resumida del método o métodos\*:

**Objetivo 1)** Para realizar estos objetivos se obtendrán muestras de sangre de pacientes con FA, así como de pacientes con ritmo sinusal y dichas muestras serán procesadas para la extracción de ADN genómico y posterior realización de amplificación de ADN (PCR) y secuenciación de las regiones genómicas de interés. La obtención de muestras se realizará en el Hospital Regional "Ciudad de Jaén", tras la obtención del correspondiente consentimiento informado por parte de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Dicho estudio tiene el visto bueno del comité de investigación del Hospital Regional "Ciudad de Jaén" como se detalla en el documento adjunto.

**Objetivos 2 y 3)** Para realizar estos objetivos usaremos un modelo ratón transgénico: el modelo de falta de función condicional del factor de transcripción Pitx2 en las cámaras auriculares. Este modelo ha sido generados en la UJA, en base a proyectos de investigación del MEC/MICINN y del CNIC (08/2009) de nuestro grupo en convocatorias anteriores. Actualmente tenemos una amplia colección de tejidos guardados a -20C y -80C, con lo cual para realizar las correspondientes aproximaciones experimentales que se detallan en esta memoria no hace falta sacrificar ningún animal de esta línea.

sometidos.

(\*) Indicar un máximo de 3 referencias bibliográficas relacionadas con el método, preferiblemente del propio equipo investigador. Caso de no existir referencias, deberá incluirse una descripción detallada del procedimiento (s) experimental a seguir.

#### 5. ANÁLISIS PREVISTO DE LOS RESULTADOS

Describir las variables que está previsto controlar, así como el criterio estadístico seguido para la selección del tamaño de muestra

##### Variables:

Las variables a controlar no dependen del numero/edad de los animales utilizados en este procedimiento experimental sino de los resultados de su rendimiento, es decir de la cantidad y calidad de ARN/ADN obtenido. Por tanto este punto no es aplicable a la presente solicitud.

#### 6. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Son aquellos que no implican el empleo de animales, permiten reducir el número o comportan un menor grado de sufrimiento al animal. Motivos de no aplicar un método alternativo al procedimiento propuesto:

No existe método alternativo al procedimiento(s) propuesto(s)	X
Existe método alternativo pero no está validado	
Desconozco su existencia para el procedimiento(s) propuesto(s)	
Otros motivos	
<u>Especificar detalladamente:</u>	

Marque con una X

#### 7. IDONEIDAD DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS Y REUTILIZACIÓN DE ANIMALES

Indicar la especie (cepa, subcepa o línea) que se propone utilizar:

Raton (Mus musculus)

Indicar los motivos de esta elección:

Esta especie es la que, en la actualidad, presenta un mayor número de cepas modificadas genéticamente que pueden ser susceptibles de aplicación para el mayor y mejor conocimiento de las bases celulares y moleculares de la expresión génica durante la cardiogenesis.

Indicar si los animales han sido utilizados previamente en otros procedimientos:

SI	
NO	x

Indicar los procedimientos:

--

## 8. EVITACIÓN DE SUFRIMIENTO O DOLOR INNECESARIO. ANALGESIA Y ANESTESIA

Indicar fases o manipulaciones en que el animal pueda experimentar dolor, sufrimiento o estrés:

NA

Indicar, en el caso de que sean aplicables, las posibles medidas correctoras que se han previsto para reducir el nivel de dolor, sufrimiento o estrés:

--

Describir la aplicación de analgésicos o anestésicos indicando:

Producto(s) a suministrar:	N/A
Vía de administración:	N/A
Dosis, frecuencia y duración del tratamiento:	N/A
Persona(s) encargada de supervisar su aplicación y eficacia(titulación):	N/A

Especificar, si es el caso, que no se aplica anestesia o analgesia porque se considera que su aplicación puede ser más traumática para el animal que el procedimiento experimental en sí:

NA

## 9. FINALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Una vez finalizado el procedimiento:

Si está previsto mantener a los animales vivos, explicar motivo(s):	No
Si está previsto sacrificar a los animales, explicar motivo(s):	No

Indicar el método(s) eutanásico aplicado y motivo de su elección

Sobredosis anestésico

Inhalación CO <sub>2</sub> o N <sub>2</sub>	
Inhalación CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	
Dislocación cervical	
Decapitación	
Otra eutanasia	Tipo :
Motivo:	

Indicar el técnico o experimentador encargada de esta función (incluida titulación)

Diego Franco Jaime

#### 10. PERSONAL INVESTIGADOR

Personas con titulación superior específica encargada del diseño y control de los procedimientos con animales vivos y el análisis de los resultados.

##### Datos del investigador/ra responsable:

Apellidos:	FRANCO JAIME			Nombre:	DIEGO
Titulación:	DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS	Años de experiencia :	16 años		
Dirección:	C/Cardenal M Spinola 1, BI II, 4E				
Indicar años de experiencia como personal investigador en el área de experimentación animal: 20 años					
¿Ha realizado algún curso de formación específica de postgrado para personal investigador?:					
SI	<input checked="" type="checkbox"/>	año:	90	Centro:	Universidad de Málaga
NO	<input type="checkbox"/>				
¿Está acreditado por la legislación vigente como personal investigador?:					
SI	<input checked="" type="checkbox"/>				
NO	<input type="checkbox"/>				

#### 11. PERSONAL EXPERIMENTADOR

Persona (s) que participan en la realización de los procedimientos en los que se usan animales de experimentación.

##### Datos del experimentador(s):

Apellidos:	FRANCO JAIME			Nombre:	DIEGO
Titulación:	DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS	Años de experiencia :	20 años		
Dirección:	C/Cardenal M Spinola 1, BI II, 4E				
Indicar años de experiencia como personal experimentador en el área de experimentación animal: 20 años					
¿Ha realizado algún curso para la formación del personal experimentador?:					
SI :	<input checked="" type="checkbox"/>	año:	1998	Centro:	Universidad de Utrecht (Países Bajos)
NO	<input type="checkbox"/>				



¿Está acreditado por la legislación vigente como personal experimentador?:					
SI :	x	año:	2004	Centro:	Junta de Andalucía
NO					

**NOTA:** adjuntar esta información para todos los experimentadores involucrados

## 12. INSTALACIONES

Indicar las instalaciones donde se mantendrán los animales durante el procedimiento y nº de registro asignado por la autoridad competente

	Nº registro:	
Otras: (especificar)	Nº registro:	

En el caso de no estar registradas, justificar la necesidad de trabajar en las instalaciones propuestas

--

La persona abajo firmante, en calidad de representante legal o titular del establecimiento solicitante indica:

1. Que la utilización de los animales que contempla este procedimiento (s) es necesaria para obtener los resultados previstos.
2. Que no existen alternativas válidas que permitan obtener estos resultados y que no impliquen la utilización del tipo de animales indicados.
3. Que el procedimiento propuesto es el que permite obtener resultados válidos utilizando el menor número posible de animales, empleando como modelo experimental el de menor grado de sensibilidad neurovegetativa y garantizando el menor dolor y sufrimiento posible de los animales utilizados.
4. Que conoce y cumplirá la legislación que regula la utilización de animales para investigación y otros fines científicos.
5. Que, de acuerdo con esta legislación, procederá a tramitar las notificaciones reglamentarias previstas (anteriores al inicio del procedimiento) y de confirmación (al finalizar el procedimiento) que requiere la utilización de animales para investigación y docencia.
6. Que asume que el informe del Comité de Bioética se referirá únicamente a los procedimientos que se ajustan a la información que se indica en este impreso, por lo que cualquier modificación será responsabilidad exclusiva del solicitante.



Firma

Fecha 5 Junio 2013

**Nombre y apellidos** Diego Franco Jaime



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

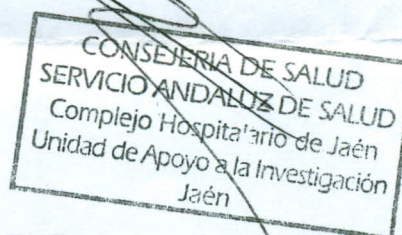
**DON FRANCISCO M. LUQUE MARTÍNEZ, SECRETARIO DE LA COMISIÓN DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN**

**CERTIFICA:**

Que ésta Comisión ha considerado emitir **informe favorable** al proyecto de Investigación presentado por el Investigador Principal D. Eduardo Vazquez Ruiz de Castroviejo del Complejo Hospitalario de Jaén, titulado: "**Genetic and functional bases of PITX2 involvement in human atrial fibrillation**".

Lo que firmo en Jaén a 10 de Marzo de dos mil diez.

El Secretario de la Comisión de Ética e Investigación,



Fdo.: D. Francisco M. Luque Martínez