

## Artículo original

La expresividad variable del síndrome de QT largo de una familia española se explica por la heterocigosis digénica en *SCN5A* y *CACNA1C*

Paloma Nieto-Marín<sup>a,1</sup>, Juan Jiménez-Jáimez<sup>b,1</sup>, David Tinaquero<sup>a</sup>, Silvia Alfayate<sup>a</sup>, Raquel G. Utrilla<sup>a</sup>, María del Mar Rodríguez Vázquez del Rey<sup>c</sup>, Francesca Perin<sup>c</sup>, Geòrgia Sarquella-Brugada<sup>d</sup>, Lorenzo Monserrat<sup>e</sup>, Josep Brugada<sup>d</sup>, Luis Tercedor<sup>b</sup>, Juan Tamargo<sup>a</sup>, Eva Delpón<sup>a,2,\*</sup> y Ricardo Caballero<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, CIBERCV, Madrid, España

<sup>b</sup> Unidad de Arritmias, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Granada, España

<sup>c</sup> Departamento de Cardiología Pediátrica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

<sup>d</sup> Departamento de Cardiología Pediátrica, Hospital San Joan de Déu, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

<sup>e</sup> Departamento de Cardiología, Health in Code, A Coruña, España

## Historia del artículo:

Recibido el 21 de noviembre de 2017

Aceptado el 6 de marzo de 2018

On-line el 21 de junio de 2018

## Palabras clave:

Síndrome de QT largo

*CACNA1C*

*SCN5A*

Cav1.2

Nav1.5

Patch-clamp

Canalopatías

$I_{NaL}$

$I_{CaL}$

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** En 4 miembros de una familia española se identificó una mutación en los canales cardiacos Nav1.5 (p.R1644H) descrita ya y relacionada con el síndrome de QT largo con anterioridad. Sin embargo, solo 1 de los portadores presentaba el intervalo QT prolongado. En los otros 3 individuos se identificó una nueva mutación con cambio de sentido en los canales cardiacos Cav1.2 (p.S1961N). En este trabajo se analizaron las características funcionales de los canales p.S1961N Cav1.2 para averiguar si dicha mutación regula la expresividad del síndrome de QT largo en esta familia.

**Métodos:** La corriente de calcio tipo L ( $I_{CaL}$ ) se registró mediante la técnica de *patch-clamp* en células de ovario de hámster chino transfectadas transitoriamente con los canales cardiacos humanos en su forma nativa o mutada.

**Resultados:** La expresión de canales p.S1961N disminuye significativamente la densidad de la  $I_{CaL}$ . Al sustituir el ion calcio por bario para suprimir la inactivación dependiente del calcio de los canales Cav1.2, se demostró que la mutación acelera significativamente la inactivación dependiente del voltaje de los canales Cav1.2 y disminuye la constante de tiempo de inactivación. Como consecuencia, la carga total que atraviesa los canales p.S1961N Cav1.2 disminuye significativamente. Los efectos que las mutaciones p.S1961N Cav1.2 y p.R1644H Nav1.5, por separado o en combinación, producen sobre las características de los potenciales de acción (PA) se simuló mediante un modelo matemático de PA ventriculares humanos. Los resultados demuestran que la mutación p.S1961N Cav1.2 abrevia la duración del PA y suprime la prolongación inducida por la mutación p.R1644H de los canales Nav1.5.

**Conclusiones:** La mutación p.S1961N en los canales Cav1.2 disminuye la  $I_{CaL}$ , un efecto que podría abreviar la duración de los PA ventriculares humanos. La presencia de esta mutación que disminuye la función de los canales Cav1.2 compensa funcionalmente los efectos producidos por la mutación de los canales Nav1.5 que aumenta su función y prolonga la duración de los PA.

© 2018 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Digenic Heterozygosity in *SCN5A* and *CACNA1C* Explains the Variable Expressivity of the Long QT Phenotype in a Spanish Family

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** A known long QT syndrome-related mutation in Nav1.5 cardiac channels (p.R1644H) was found in 4 members of a Spanish family but only 1 of them showed prolongation of the QT interval. In the other 3 relatives, a novel missense mutation in Cav1.2 cardiac channels was found (p.S1961N). Here, we functionally analyzed p.S1961N Cav1.2 channels to elucidate whether this mutation regulates the expressivity of the long QT syndrome phenotype in this family.

**Methods:** L-type calcium current ( $I_{CaL}$ ) recordings were performed by using the whole-cell patch-clamp technique in Chinese hamster ovary cells transiently transfected with native and/or p.S1961N Cav1.2 channels.

**Results:** Expression of p.S1961N channels significantly decreased  $I_{CaL}$  density. Using Ba as a charge carrier to suppress the Ca-dependent inactivation of Cav1.2 channels, we demonstrated that the

## Keywords:

Long QT syndrome

*CACNA1C*

*SCN5A*

Cav1.2

Nav1.5

Patch-clamp

Channelopathies

$I_{NaL}$

$I_{CaL}$

\* Autor para correspondencia: Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, España.

Correo electrónico: edelpon@med.ucm.es (E. Delpón).

<sup>1</sup> Ambos autores han contribuido por igual a este trabajo.

<sup>2</sup> Ambos autores son coautores sénior.

mutation significantly accelerates the voltage-dependent inactivation of Cav1.2 channels decreasing the inactivation time constant. As a consequence, the total charge flowing through p.S1961N Cav1.2 channels significantly decreased. The effects of the p.S1961N Cav1.2 and p.R1644H Nav1.5 mutations alone or their combination on the action potential (AP) morphology were simulated using a validated model of the human ventricular AP. The p.S1961N Cav1.2 mutation shortens the AP duration and abrogates the prolongation induced by p.R1644H Nav1.5 channels.

**Conclusions:** The p.S1961N mutation in Cav1.2 channels decreased the  $I_{CaL}$ , an effect which might shorten ventricular AP. The presence of the loss-of-function Cav1.2 mutation could functionally compensate the prolonging effects produced by the Nav1.5 gain-of-function mutation.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org/en](http://www.revespcardiol.org/en)

© 2018 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Abreviaturas

DPA: duración del potencial de acción

$I_{Ba}$ : corriente generada por los canales Cav1.2 que utilizan Ba como portador de carga

$I_{CaL}$ : corriente de Ca de tipo L

IDV: inactivación dependiente del voltaje

SQTL: síndrome de QT largo

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de QT largo (SQTL) es un síndrome arritmógeno primario y hereditario que se caracteriza por un intervalo QT prolongado en el electrocardiograma (ECG), causado por un retraso en la repolarización ventricular y asociado con síncope, convulsiones, taquicardia ventricular (principalmente *torsades de pointes*) y alto riesgo de muerte súbita cardíaca<sup>1,2</sup>. La duración del potencial de acción (DPA) ventricular es el resultado de un equilibrio entre las corrientes despolarizantes (Na y Ca) y repolarizantes (K). En consecuencia, tanto un aumento en las corrientes despolarizantes como una disminución en las corrientes repolarizantes podrían originar los distintos tipos de SQTL<sup>1,2</sup>.

El SQTL de tipo 3 se debe a mutaciones de ganancia de función en el gen *SCN5A*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio (Nav1.5) encargados de la corriente cardíaca de sodio ( $I_{Na}$ )<sup>3</sup>. Estas mutaciones suelen modificar la cinética de los canales Nav1.5 por medio de diversos mecanismos biofísicos que conducen en última instancia a un aumento del componente lento o sostenido de la  $I_{Na}$  ( $I_{NaL}$ ) que genera una entrada de Na persistente durante la fase de meseta del PA ventricular que prolonga la DPA<sup>3</sup>.

Los genes *CACNA1C*, *CACNB2* y *CACNA2D1* codifican la subunidad  $\alpha$  formadora del poro (Cav1.2) y las subunidades auxiliares  $\beta 2$  y  $\alpha 2\delta$ , respectivamente, que constituyen el canal de Ca cardíaco que genera la corriente de Ca de tipo L ( $I_{CaL}$ )<sup>4</sup>. Las mutaciones de pérdida de función en los genes *CACNA1C* y *CACNB2* acortan la DPA y se han asociado con el síndrome de Brugada y el síndrome de QT corto<sup>5,6</sup>. Por el contrario, las mutaciones de ganancia de función en el gen *CACNA1C* producen la prolongación de la DPA ventricular y SQTL de tipo 8<sup>7</sup>.

En 4 miembros de una familia española, en la que solo 1 de los portadores presentaba un fenotipo de SQTL de tipo 3, se identificó una mutación de ganancia de función en el gen *SCN5A* que codifica los canales p.R1644H Nav1.5 ya descrita previamente<sup>8</sup>. Los análisis genéticos de los otros 3 miembros que presentaban valores QT corregidos (QTc) normales demostraron que, además, eran portadores de una nueva mutación con cambio de sentido en el gen *CACNA1C*, que codifica los canales p.S1961N Cav1.2. En consecuencia, estos miembros de la familia son portadores de 2 variantes en distintos genes (heterocigosis digénica). Así pues, el objetivo de este estudio es caracterizar las propiedades electrofisiológicas de los canales p.S1961N Cav1.2 para dilucidar si la presencia de esta

variante podría compensar la prolongación de la DPA producida por la mutación p.R1644H Nav1.5 y con ello el SQTL.

## MÉTODOS

### Análisis genético

Se realizó la evaluación clínica, incluido un ECG de 12 derivaciones, de los miembros de la familia en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. El estudio fue aprobado por el comité de ética local y se realizó de acuerdo con los principios indicados en la Declaración de Helsinki. Cada participante dio su consentimiento informado por escrito<sup>9–11</sup>.

Toda la secuencia codificante y las regiones intrónicas complementarias de los genes *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNJ2*, *KCNJ8*, *CACNA1C*, *AKAP9*, *KCNE1* y *KCNE2* se secuenciaron utilizando una plataforma de secuenciación de segunda generación HiSeq 1500 (Illumina). Las variantes potencialmente patógenas se confirmaron utilizando la secuenciación de Sanger<sup>9–11</sup>. La patogenicidad de las variantes se predijo según las recomendaciones actuales del *American College of Medical Genetics and Genomics* y la *Association for Molecular Pathology* (véanse detalles en el apartado «Análisis genético» del material suplementario)<sup>12</sup>. Se hallaron otras variantes exónicas no sinónimas, no predichas como patógenas, que se describen en la [tabla del material suplementario](#).

### Mutagénesis y transfección celular

La sustitución de p.S1961N en Cav1.2 (NP\_000710.5) se llevó a cabo utilizando el *kit* de mutagénesis dirigida *QuikChange* (Stratagene, Estados Unidos) y se confirmó mediante secuenciación directa de ácido desoxirribonucleico (ADN)<sup>5,9,11,13</sup>. Se transfectaron transitoriamente células de ovario de hámster chino con el ADNc que codifica los canales Cav1.2 nativos (WT) o mutados y las subunidades  $\alpha 2\delta$  y  $\beta$  (en proporción 1:1,7:4).

### Técnica de patch-clamp

Las corrientes se registraron utilizando la configuración «célula entera» de la técnica de «fijación de membrana» (*patch-clamp*) siguiendo los métodos descritos anteriormente<sup>9,13</sup>. La resistencia de acceso, la capacitancia celular y la amplitud máxima de la  $I_{CaL}$  generadas por los canales Cav1.2 WT fueron de  $1,8 \pm 0,4 \text{ M}\Omega$ ,  $16,2 \pm 1,2 \text{ pF}$  y  $-521 \pm 60 \text{ pA}$  ( $n = 25$ ) respectivamente. Por lo tanto, no se esperaban errores de voltaje significativos ( $< 5 \text{ mV}$ ) debidos a la resistencia en serie con las micropipetas utilizadas.

### Modelo matemático del potencial de acción ventricular

Para simular las condiciones del PA ventricular humano, se empleó el modelo de O'Hara-Rudy validado anteriormente y utilizado con finalidades parecidas<sup>14</sup>. El modelo se ejecutó a

distintas frecuencias (0,1-3 Hz) en condiciones de control (WT) o incorporando los cambios en la  $I_{NaL}$  y la  $I_{CaL}$  producidos por las mutaciones p.R1644H Nav1.5 y p.S1961N Cav1.2 respectivamente.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media. Cuando fue apropiado se recurrió a la prueba de la t de Student apareada o desapareada o ANOVA unifactorial, seguido de la prueba de Newman-Keuls para evaluar la significación estadística. Para incluir las evaluaciones sucesivas de las muestras, los datos se analizaron con modelos multinivel de efectos mixtos. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. En el material suplementario está disponible un apartado de «Métodos» ampliado.

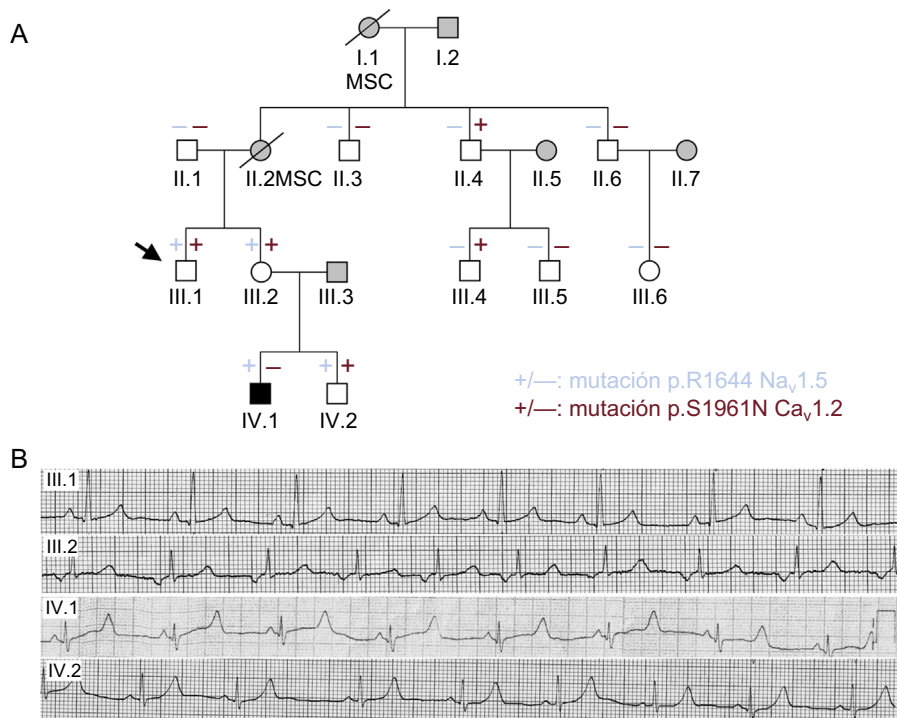
## RESULTADOS

### Descripción de los casos y análisis genético

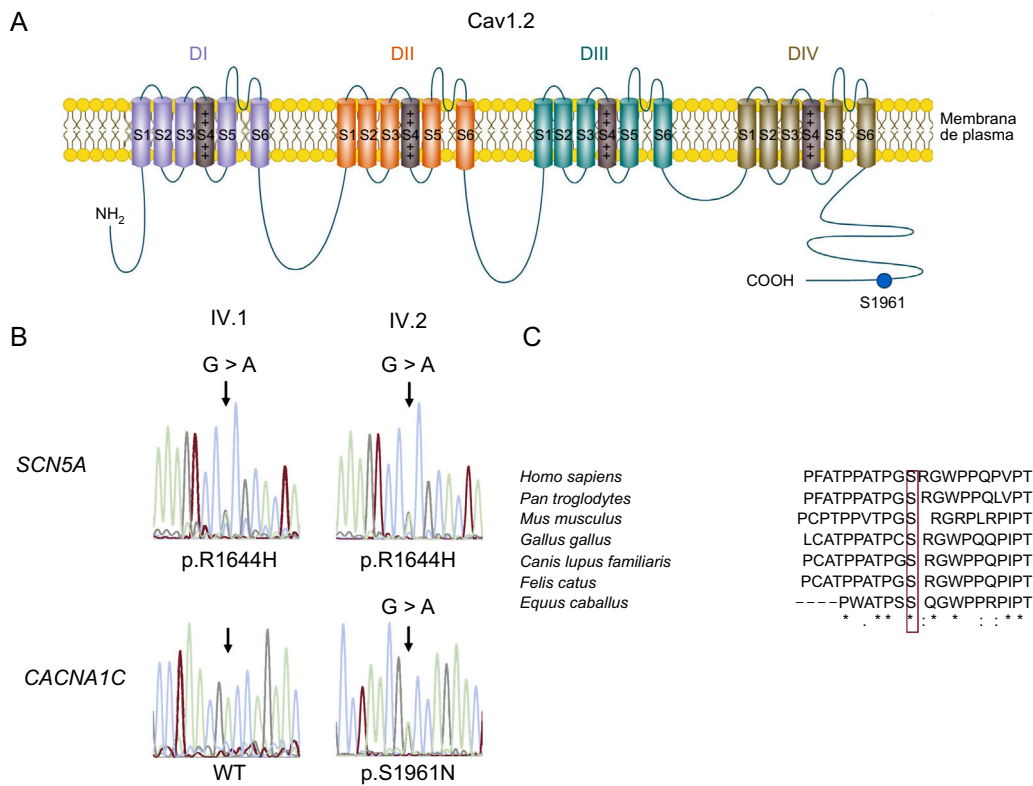
El probando (III.1) (figura 1A, flecha) sufrió un episodio sincopal cuando tenía 28 años, después de haber tomado una única dosis de ciprofloxacino, un fármaco que prolonga el QT<sup>15</sup>. Esto indicaba que podría tener predisposición genética a la prolongación del QT inducida por fármacos. Por el contrario, la evaluación clínica reveló que presentaba un ECG normal con un QTc de Bazett de 420 ms (figura 1B). No obstante, tanto su madre (II.2) como su abuela (I.1), que no habían sufrido nunca episodios sincopales, fallecieron de manera súbita estando en reposo a la edad de 49 años (no se dispone de datos clínicos o genéticos). En consecuencia, los antecedentes familiares de muerte súbita cardiaca propiciaron la evaluación de los familiares del probando. La hermana del probando (III.2) mostró un ritmo auricular inferior a 60 lpm, duraciones PR y QRS normales, y una onda T ligeramente prolongada (figuras 1A y B). No obstante, el

QT disminuyó correctamente durante el ejercicio y el QTc fue también normal (430 ms). Uno de los sobrinos del probando (IV.1), un chico de 13 años, mostró un ECG con una onda T tardía tras un segmento ST plano y largo, lo que resultó en un QTc notablemente prolongado (558 ms) (figura 1B). Por el contrario, el individuo IV.2 mostró un QTc de 420 ms con una onda T normal (figura 1B). El resto de los familiares estudiados (figura 1A, símbolos blancos) han permanecido y permanecen actualmente asintomáticos, con ECG completamente normales.

Teniendo en cuenta los datos clínicos, se ofreció un análisis genético mediante secuenciación masiva de segunda generación (véase «Métodos») tanto al probando, quien en un inicio lo rechazó, como a su hermana, que aceptó. La genotipificación de la hermana del probando permitió identificar 2 mutaciones (heterocigosis digénica). Estas mutaciones se secuenciaron después mediante el método de Sanger en el probando (que finalmente aceptó) y los demás familiares estudiados. La primera mutación, predicha como patógena (véase el apartado «Análisis genético» del material suplementario), apareció en el gen *SCN5A* (NC\_000003.11:g.38592932C>T según GRCh37) y produce la sustitución de arginina por histidina en el residuo 1644 (p.R1644H) de los canales Nav1.5. Esta mutación ya se había descrito con anterioridad en varias familias con SQTL de tipo 3 y nunca se ha relacionado con ningún otro fenotipo arritmico, incluido el síndrome de Brugada<sup>8,16-18</sup>. Los estudios funcionales revelaron que la mutación p.R1644H produce un aumento notable de la  $I_{NaL}$  (de ganancia de función), lo que explica la prolongación de la DPA y del QT<sup>8,16</sup>. La mutación p.R1644H Nav1.5 también estaba presente en el probando y sus sobrinos, pero en ningún otro de los familiares estudiados (figura 1A). En la hermana del probando, en este y en 1 de sus sobrinos (figura 1A) también se identificó una mutación en el gen *CACNA1C* (NC\_000012.11:g.2797710G>A) (figura 2B) que produce la sustitución de la serina en la posición 1961 por asparagina (p.S1961N) en el canal Cav1.2 (figura 2A). El residuo de serina en la posición equivalente está muy conservado en las distintas especies



**Figura 1.** A: árbol genealógico de la familia (mujeres [○] y varones [□]). La flecha indica el probando. Las líneas en diagonal indican los pacientes fallecidos. + y - indican individuos con y sin las variantes p.R1644H Nav1.5 (azul) y p.S1961N Cav1.2 (rojo) respectivamente. Los símbolos en negro indican individuos afectados por el síndrome de QT largo, mientras que los símbolos en gris representan a individuos que no se han sometido a pruebas genéticas. Los símbolos en blanco representan a individuos estudiados sin ningún fenotipo clínico. B: electrocardiograma de los pacientes III.1, III.2, IV.1 y IV.2. MSC: muerte súbita cardiaca. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.



**Figura 2.** A: esquema del canal de calcio cardíaco de tipo L. B: cromatogramas de secuencias de ADN de los pacientes IV.1 y IV.2 que representan la variación heterocigótica (NC\_000003.11:g.38592932C>T) del gen *SCN5A*, que produce la mutación con cambio de sentido p.R1644H en ambos individuos (parte superior), y una secuencia WT (izquierda) y la mutación heterocigótica (NC\_000012.11:g.2797710G>A) (derecha) del gen *CACNA1C*, que da como resultado la mutación con cambio de sentido p.S1961N (parte inferior). C: alineación de secuencias de las regiones que rodean el residuo S1961 de los canales Cav1.2 en varias especies; el recuadro destaca la conservación de este residuo. «\*» indica residuos idénticos; «:» y «.» indican la conservación entre los grupos de propiedades muy y algo similares respectivamente. ADN: ácido desoxirribonucleico; WT: forma nativa del canal.

(figura 2C) y la mutación no se ha anotado con anterioridad en ninguna base de datos pública. Cabe destacar que los individuos II.4 y III.4 también eran portadores de la mutación p.S1961N Cav1.2, pero ambos presentaban un ECG normal y no habían sufrido nunca un episodio arrítmico.

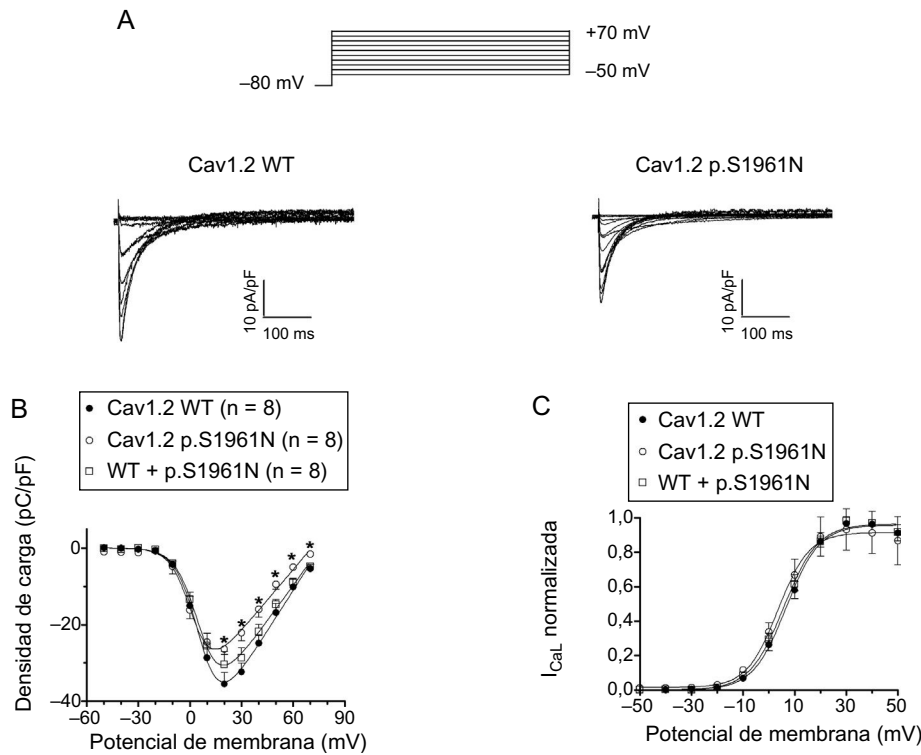
En consecuencia, los miembros de la familia que mostraron heterocigosis digénica no presentaban un fenotipo de SQT de tipo 3, mientras que sí lo tenía IV.1, que es el único portador de solo la mutación en el gen *SCN5A*. Así pues, se decidió caracterizar funcionalmente la mutación p.S1961N Cav1.2 para dilucidar si la presencia de esta variante puede anular la prolongación de la DPA y compensar el SQT producido por la mutación p.R1644H Nav1.5.

#### Caracterización funcional de los canales p.S1961N Cav1.2

La figura 3A muestra los trazos de la  $I_{CaL}$  registrados a potenciales entre -50 y +70 mV en células de ovario de hámster chino que expresan canales Cav1.2 cardíacos humanos nativos o mutantes junto con las subunidades  $\alpha 2\delta$  y  $\beta$ . La densidad máxima de las corrientes generadas por los canales Cav1.2 mutantes ( $-26,4 \pm 1,4$  pA/pF;  $p < 0,05$ ) fue aproximadamente un 25% menor que la generada por los canales Cav1.2 nativos ( $-35,5 \pm 3,0$  pA/pF) (figuras 3A y B). En otro grupo de experimentos, se transfectaron células con el ADNc que codifica los canales Cav1.2 nativos y mutantes (en proporción 0,5:0,5) considerando que los portadores de la mutación lo son en heterocigosis. En estas condiciones, la densidad de corriente máxima no fue estadísticamente distinta de la generada por los canales nativos y mutantes por separado (figura 3B;  $p > 0,05$ ). La figura 3C muestra la dependencia de voltaje de la activación de los canales Cav1.2 WT, p.S1961N y WT+p.S1961N obtenida representando la conductancia

normalizada (estimada por la ecuación n.º 1; véase el apartado «Patch-clamping» del material suplementario) en función del potencial de membrana. El ajuste de una función de Boltzmann permitió obtener los valores de punto medio ( $V_h$ ) y pendiente ( $k$ ) de las curvas, que casi se superponen (figura 3C). En consecuencia, los valores de  $V_h$  y de  $k$  de las 3 curvas no fueron significativamente distintos (tabla). El ajuste de la ecuación n.º 2 (véase el apartado «Patch-clamping» del material suplementario) a los datos de densidad de corriente en función del voltaje de cada experimento permitió calcular el potencial de inversión ( $E_{rev}$ ), que resultó ser de  $74,9 \pm 2,7$  mV para los canales nativos (WT). Los canales mutantes, ya fuera solos o en combinación con canales nativos (WT), presentaban el mismo valor de  $E_{rev}$  ( $p > 0,05$ ) (tabla).

La figura 4A muestra trazos superpuestos de  $I_{CaL}$  obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms desde -80 a +20 mV en células que expresan canales Cav1.2 nativos o mutantes (las corrientes generadas por los canales WT+p.S1961N se omitieron para mayor claridad). La cinética de activación de los canales Cav1.2 no fue modificada por la mutación p.S1961N (tabla;  $p > 0,05$ ). Sin embargo, la mutación aceleró significativamente el curso temporal de la inactivación de la corriente (figura 4A), disminuyendo la constante de tiempo de inactivación rápida ( $\tau_{rápida}$ ) calculada por el ajuste de una función biexponencial a la caída de la corriente (figura 4B y tabla). Curiosamente, la  $\tau_{rápida}$  de la corriente generada por los canales WT+p.S1961N fue intermedia (figura 4B y tabla). Por lo tanto, para cuantificar los efectos producidos por la mutación p.S1961N en el flujo total de Ca, se midió la densidad de carga generada por los canales Cav1.2 WT, p.S1961N y WT+p.S1961N a cada potencial de membrana (figura 4C). La densidad, por su parte, se calculó normalizando la carga que atraviesa la membrana,



**Figura 3.** A: corrientes generadas por los canales Cav1.2 WT o p.S1961N. B y C: curvas de densidad (B) y de conductancia (C) en función del voltaje para la  $I_{CaL}$  generada por los canales Cav1.2 WT, p.S1961N o WT+p.S1961N; cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de la media de (n) experimentos. En B, \* $p < 0,05$  frente a Cav1.2 WT.  $I_{CaL}$ : corriente de Ca de tipo L; WT: forma nativa del canal.

estimada a partir de la integral de los trazos de corriente, con respecto a la capacitancia celular (véase el apartado «Métodos» del material suplementario). La mutación p.S1961N en los canales Cav1.2 disminuye de manera significativa la carga que atraviesa la membrana por los efectos combinados de la mutación en la densidad de corriente máxima, y en la cinética de la inactivación, generan una carga (figura 4C).

La figura 4D (parte superior) muestra los trazos de la  $I_{CaL}$  generados por los canales Cav1.2 nativos junto con el protocolo utilizado para cuantificar la dependencia de voltaje de la inactivación y describir las curvas de inactivación («Métodos» del material suplementario) (figura 4D, abajo). Ni el  $V_h$  ni la  $k$  de las curvas de inactivación se modificaron por la mutación p.S1961N sola o combinada con los canales WT (figura 4D y tabla).

### La mutación p.S1961N aceleró la inactivación de los Cav1.2 dependientes de voltaje

La inactivación de los canales Cav1.2 consiste en 2 mecanismos independientes, la inactivación dependiente del Ca (IDC) y la inactivación dependiente del voltaje (IDV). Se probaron los efectos de la mutación p.S1961N en la IDV utilizando Ba como transportador de carga, ya que las corrientes de Ba ( $I_{Ba}$ ) no muestran IDC<sup>19</sup>. La figura 5A muestra los trazados de la  $I_{Ba}$  generados en 2 células de ovario de hámster chino transfectados con canales Cav1.2 nativos y mutantes respectivamente. El curso temporal de la inactivación de la  $I_{Ba}$ , definida por una función monoexponencial, se aceleró notablemente por la mutación (figura 5B y tabla). Además, la mutación disminuyó significativamente tanto la  $I_{Ba}$  máxima como

#### Tabla

Propiedades biofísicas de los canales Cav1.2 nativos y mutantes

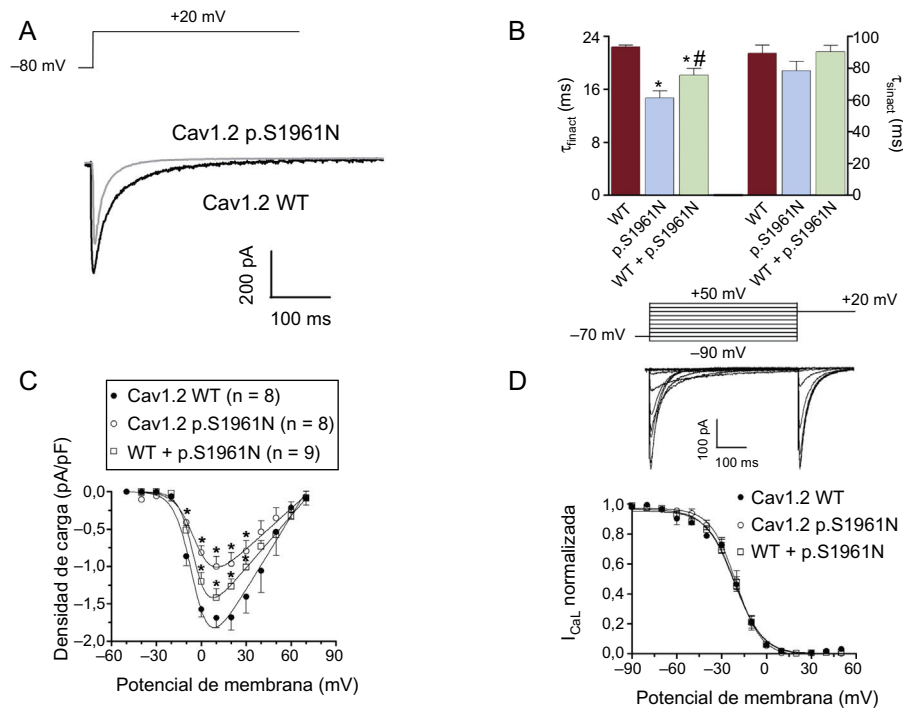
Constructo Cav1.2 ( $I_{CaL}$ )	Carga a +20 mV (pC/pF)	$E_{rev}$ (mV)	Activación			Inactivación			
			$V_h$ (mV)	$k$	$\tau$ (ms)	$V_h$ (mV)	$k$	$\tau_{rápida}$ (ms)	$\tau_{lenta}$ (ms)
WT (n = 8)	$-1,7 \pm 0,2$	$74,9 \pm 2,7$	$7,3 \pm 1,4$	$6,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,03$	$-19,1 \pm 1,2$	$7,0 \pm 0,9$	$22,4 \pm 0,3$	$89,4 \pm 5,1$
p.S1961N (n = 8)	$-1,0 \pm 0,1^a$	$73,2 \pm 1,3$	$5,5 \pm 1,3$	$6,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$-20,6 \pm 2,2$	$7,8 \pm 0,5$	$14,7 \pm 1,1^a$	$78,3 \pm 6,0$
WT+p.S1961N (n = 9)	$-1,4 \pm 0,1^{a,b}$	$76,1 \pm 0,9$	$6,1 \pm 1,6$	$6,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$-21,1 \pm 2,3$	$7,9 \pm 0,6$	$18,1 \pm 1,0^{a,b}$	$90,3 \pm 3,9$
Constructo Cav1.2 ( $I_{Ba}$ )	Carga a +10 mV (pC/pF)	$E_{rev}$ (mV)	$V_h$ (mV)	$k$	$\tau$ (ms)	$V_h$ (mV)	$k$	$\tau$ (ms)	
WT (n = 13)	$-4,5 \pm 1,1$	$55,7 \pm 0,9$	$-3,4 \pm 1,3$	$4,9 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,1$	$-27,9 \pm 4,4$	$8,7 \pm 1,6$	$67,5 \pm 3,3$	
p.S1961N (n = 10)	$-1,6 \pm 0,3^a$	$54,8 \pm 1,7$	$-0,8 \pm 1,3$	$5,1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$-30,0 \pm 4,6$	$7,9 \pm 1,0$	$43,1 \pm 3,9^a$	

$E_{rev}$ : potencial de inversión;  $I_{Ba}$ : corriente generada utilizando Ba como portador de carga;  $I_{CaL}$ : corriente de Ca de tipo L;  $\tau$ : constantes de tiempo de activación ( $I_{CaL}$ )/inactivación ( $I_{Ba}$ ) obtenidas ajustando una función monoexponencial a los trazos de corriente registrados a +20 mV;  $\tau_{rápida}$  y  $\tau_{lenta}$ : constantes de tiempo rápida y lenta de la inactivación ( $I_{CaL}$ ) obtenidas tras ajustar una función biexponencial a los trazos de corriente registrados a +20 mV;  $V_h$  y  $k$ : valores del punto medio y la pendiente de las curvas de inactivación y activación; WT: forma nativa de los canales.

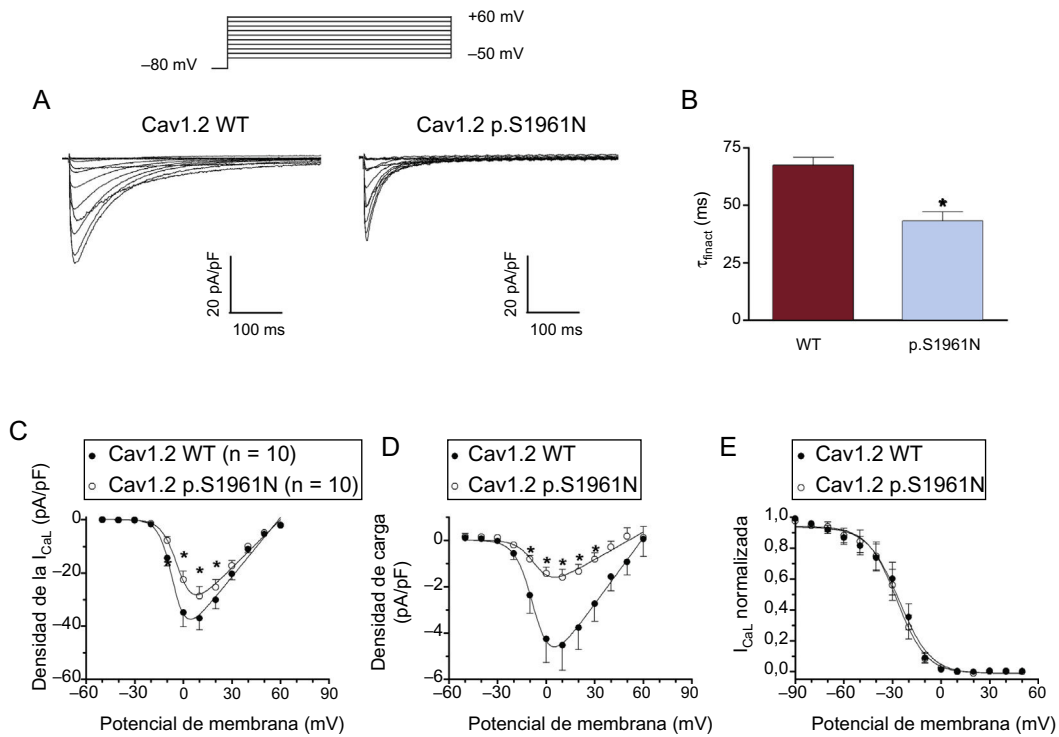
Los valores expresan la media  $\pm$  error estándar de la media de (n) experimentos en cada grupo.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  frente a WT.

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  frente a p.S1961N.

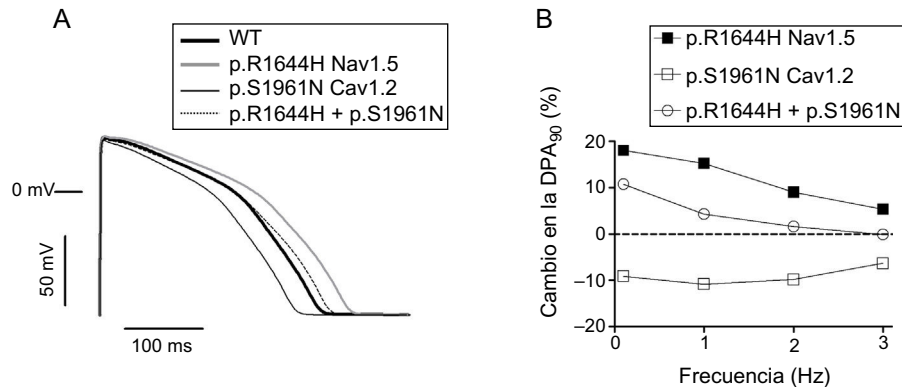


**Figura 4.** A: trazos de corriente superpuestos generados a +20 mV por los canales Cav1.2 WT o p.S1961N. B: constantes de tiempo rápida y lenta de la inactivación obtenida a +20 mV en células que expresan canales Cav1.2 WT, p.S1961N o WT+p.S1961N. C: carga estimada como la integral de los trazos de corriente registrados en función del potencial de membrana en los 3 grupos. D: arriba, corrientes generadas por los canales Cav1.2 WT utilizando el protocolo descrito; abajo, curvas de inactivación para los canales Cav1.2 WT, p.S1961N o WT+p.S1961N; cada línea/punto representa la media  $\pm$  error estándar de la media de 8 o más experimentos. En B y C, \* $p < 0,05$  frente a Cav1.2 WT. WT: forma nativa del canal.



**Figura 5.** A: trazos de  $I_{Ba}$  generados por los canales Cav1.2 WT o p.S1961N. B–E: constantes de tiempo de inactivación obtenidas a +10 mV (B), curvas obtenidas al representar la densidad de corriente (C) o la densidad de carga (D) en función del voltaje y curvas de inactivación (E) para la  $I_{Ba}$  generada por los canales WT o p.S1961N; cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de la media de 10 experimentos. En B y C, \* $p < 0,05$  frente a Cav1.2 WT. WT: forma nativa del canal.

## Modelo matemático O'Hara-Rudy



**Figura 6.** A: potenciales de acción generados por el modelo O'Hara-Rudy en miocitos ventriculares endocárdicos a 1 Hz en condiciones de control (WT) o en presencia de las mutaciones p.R1644H Nav1.5 y p.S1961N Cav1.2 por separado o combinadas. B: porcentaje de la prolongación (valores positivos) o el acortamiento (valores negativos) de la DPA<sub>90</sub> inducidos por las mutaciones solas o combinadas entre sí en las células endocárdicas estimuladas a 0,1-3 Hz. DPA: duración del potencial de acción; WT: forma nativa del canal.

la densidad de la  $I_{Ba}$  y la disminución de la carga fue mayor que la de la corriente máxima (figuras 5C y D). Por último, la dependencia del voltaje de la inactivación de la  $I_{Ba}$  no se modificó por la mutación (figura 5E y tabla). Todos estos resultados indican claramente que la mutación p.S1961N acelera la IDV de los canales Cav1.2.

#### Simulación de los efectos de la mutación p.S1961N en el potencial de acción cardíaco

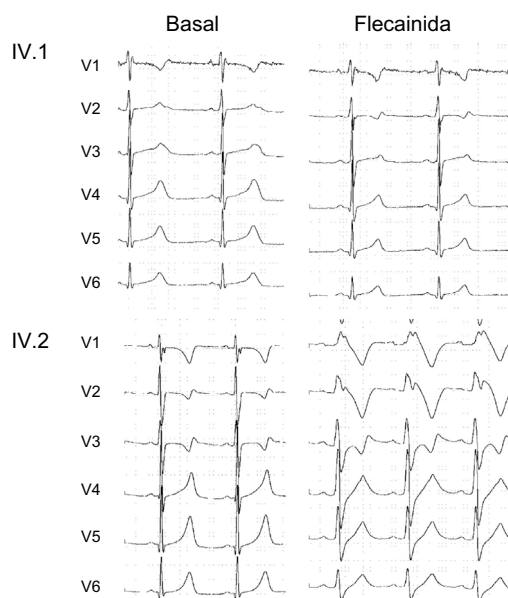
Los efectos de las mutaciones p.S1961N Cav1.2 y p.R1644H Nav1.5, solas o combinadas, en las características del PA se simularon utilizando un modelo matemático ya validado de PA ventriculares endocárdicos humanos (figura 6)<sup>14</sup>. El modelo se ejecutó en condiciones de control (WT) o introduciendo los cambios cinéticos y en la conductancia producidos por la mutación p.S1961N Cav1.2. Para simular los efectos de la mutación p.R1644H, se aumentó la conductancia de la  $I_{NaL}$   $\approx 3$  veces, considerando el efecto producido por la mutación descrito con anterioridad<sup>8</sup>. La figura 6A muestra los trazos de los PA obtenidos al correr el modelo

considerando una frecuencia basal de 1 Hz. La mutación p.R1644H Nav1.5 prolongó la DPA<sub>20</sub>, la DPA<sub>50</sub> y la DPA<sub>90</sub> el 17,4, el 17,1 y el 15,2% respectivamente. Dada la reducción en la  $I_{CaL}$ , p.S1961N Cav1.2 acortó la DPA<sub>20</sub>, la DPA<sub>50</sub> y la DPA<sub>90</sub> el 2,7, el 14,3 y el 10,8% (figura 6A). Curiosamente, los trazos de los PA correspondientes a p.R1644H+p.S1961N y WT eran prácticamente indistinguibles, y solo se observó una ligera prolongación de la DPA<sub>90</sub> (4,3%). La figura 6B representa el cambio en la DPA<sub>90</sub> (prolongación o acortamiento) inducido por cada mutación en células estimuladas a distintas frecuencias (0,1-3 Hz). La prolongación inducida por p.R1644H Nav1.5 fue máxima a bajas frecuencias y disminuyó progresivamente a frecuencias más altas. El acortamiento inducido por p.S1961N Cav1.2 fue similar a frecuencias entre 0,1 y 2 Hz ( $\approx 10\%$ ) y disminuyó ligeramente a 3,0 Hz. En presencia de p.S1961N, la prolongación inducida por p.R1644H se redujo hasta desaparecer por completo a las frecuencias más altas (2 y 3 Hz).

#### Implicaciones terapéuticas de los resultados funcionales

Las recomendaciones por consenso de expertos sobre las intervenciones terapéuticas en el SQTL consideran que los inhibidores de la  $I_{NaL}$ , como la flecainida, pueden ser útiles como tratamiento complementario para los pacientes con SQTL de tipo 3<sup>20</sup>. En consecuencia, se comprobó la inocuidad y la eficacia de la flecainida infundiéndola al paciente IV.1. el fármaco por vía intravenosa (2 mg/kg), en condiciones controladas, antes de implementar un tratamiento con este fármaco. La figura 7A muestra que, en el portador de la mutación de ganancia de función en *SCN5A*, la flecainida acortó el intervalo QT (el QTc se redujo de 558 a 470 ms) sin inducir respuesta arrítmica alguna. Así pues, para este chico, se añadió flecainida por vía oral al tratamiento con atenolol a la dosis máxima tolerada (50 mg/día) para la profilaxis de futuros eventos arrítmicos.

Por el contrario, las mutaciones de pérdida de función en el gen *CACNA1C* se han relacionado con el síndrome de Brugada<sup>5</sup>, cuyo diagnóstico es definitivo cuando se observa una elevación del segmento ST de tipo I en las derivaciones precordiales tras la administración de flecainida por vía intravenosa. Puesto que el análisis funcional puso de relieve que la mutación p.S1961N Cav1.2 reduce la densidad de la  $I_{CaL}$ , la pregunta era si la presencia de la mutación en el gen *CACNA1C* conduciría a un patrón parecido al del síndrome de Brugada en presencia de flecainida<sup>11</sup>. En consecuencia, se realizó un test de flecainida al paciente IV.2, portador del gen *SCN5A* y de la mutación de pérdida de función en el gen *CACNA1C*. Curiosamente, la infusión intravenosa de flecainida (también a



**Figura 7.** Registros electrocardiográficos (V<sub>1</sub>-V<sub>6</sub>) del paciente IV.1 (arriba) y del paciente IV.2 (abajo) antes (control) y a los 10 min de recibir una infusión intravenosa de flecainida 2 mg/kg.

2 mg/kg) durante 10 min produjo en este paciente un ensanchamiento del QRS y un patrón parecido al del síndrome de Brugada sin modificar el QTc (figura 7).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se describe funcionalmente una nueva mutación con cambio de sentido localizada en la parte distal del dominio C-terminal de Cav1.2 (p.S1961N). Esta mutación se descubrió en un probando y en 4 miembros de una familia española con antecedentes de síncope y muerte súbita cardiaca. Los resultados demostraron que la mutación p.S1961N disminuía la densidad de la  $I_{CaL}$ , lo que probablemente acorta la duración de la fase de meseta del PA cardiaco.

El sobrino mayor del probando sufría un SQTl de tipo 3, y se constató que era portador de la mutación p.R1644H Nav1.5. No obstante, su madre, su hermano y su tío (el probando) también eran portadores de la mutación p.R1644H Nav1.5 pero no presentaban SQTl. Esto podía explicarse por la expresividad a menudo variable del SQTl entre los portadores de una mutación, que en algunas familias puede explicarse por la presencia de múltiples mutaciones en el mismo gen u otros distintos (heterocigosis compuesta o digélica respectivamente) o por polimorfismos en un solo nucleótido (PMN)<sup>9,10,21</sup>. La compensación funcional entre mutaciones o polimorfismos en el gen *SCN5A* ya se ha descrito con anterioridad en algunos individuos y familias<sup>10,22,23</sup>. Es el caso del polimorfismo común p.H558R de Nav1.5 cuando aparece en el mismo alelo (*cis*) o en uno distinto (*trans*) de la mutación<sup>10,21,23</sup>. Además, se ha visto que 2 mutaciones del gen *SCN5A* en *trans* (heterocigosis compuesta) pueden interactuar y mejorar mutuamente sus respectivos efectos deletéreos<sup>10,24</sup>. No obstante, no se hallaron otros polimorfismos o mutaciones en el gen *SCN5A* en ninguno de los miembros de la familia aquí estudiada.

Algunas mutaciones del gen *SCN5A* pueden originar un amplio espectro de fenotipos de la enfermedad entre los distintos portadores, con lo que se producen «síndromes solapados o superpuestos»<sup>11,25</sup>. De hecho, se ha demostrado que la sustitución de la Arg 1644 de los canales Nav1.5 por Cys (p.R1644C) en algunos individuos produce SQTl de tipo 3<sup>26</sup> y en otros, síndrome de Brugada<sup>27</sup>. Sin embargo, no es el caso en la familia aquí estudiada, en la que, aparte del fenotipo de SQTl de tipo 3 del paciente IV.1, no aparecieron otros rasgos electrocardiográficos que indicaran otro fenotipo arritmico. Esto concuerda con los datos ya comentados en relación con otras familias portadoras de la mutación de ganancia de función p.R1644H, que se ha asociado exclusivamente con el SQTl de tipo 3<sup>17,18</sup>.

### La mutación p.S1961N de Cav1.2 reduce la densidad de la corriente de Ca de tipo L

A potenciales de membrana fisiológicamente relevantes, la densidad máxima de la  $I_{CaL}$  generada por los canales p.S1961N Cav1.2 disminuyó un ~25% y la carga total que atraviesa la membrana, un ~40%. Por el contrario, cuando las células se transfectaron simultáneamente con canales Cav1.2 nativos y mutantes (en proporción 0,5:0,5) para «reproducir» la condición de heterocigosis de los portadores, la disminución de la corriente se redujo. Estos resultados coinciden con el fenotipo leve-normal de los portadores de la mutación p.S1961N, cuyos ECG e intervalos QT son normales, tanto si la presentaban simultáneamente con la mutación Nav1.5 (III.1, III.2, IV.2) como si no (II.4 y III.4). Funcionalmente, el rasgo distintivo de la mutación fue la aceleración de la cinética de inactivación de los canales Cav1.2 sin que ello se acompañara de alteraciones en la dependencia del voltaje de la activación o la inactivación.

Como se ha dicho, la inactivación de los canales Cav1.2 consiste en la IDC y la IDV<sup>19,28</sup>. La IDC está controlada principalmente por la unión de Ca/calmodulina a un motivo IQ y prácticamente se anula

cuando se utiliza Ba como portador de carga<sup>19</sup>. Los determinantes moleculares de la IDV, que entre otros incluyen el dominio C-terminal de los canales Cav1.2, son múltiples y complejos<sup>28</sup>. Datos previos han demostrado que la presencia de mutaciones del canal Cav1.2 en el sitio de unión a calcineurina (CaN) (residuos 1913–1941; NP\_000710.5) aumenta notablemente la IDV<sup>29</sup>. Además, se ha señalado que el sitio de unión a CaN es el motivo regulador de la IDV del canal de Ca cardiaco<sup>30</sup>, que se superpone parcialmente con el sitio de unión a la proteína-fosfatasa 2 A (PP2A) (residuos 1928–1970)<sup>31</sup>. Según esto, el residuo p.S1961 se ubica en la región C-terminal del sitio de unión a PP2A. Nuestros resultados han demostrado que la mutación p.S1961N aumenta principalmente la IDV de los canales Cav1.2 y, en consecuencia, podría especularse que la mutación aumenta la unión a PP2A o su función. En realidad, algunos estudios señalan que la desfosforilación mediada por la PP2A de los canales Cav1.2 inhibe su función al antagonizar el aumento de la  $I_{CaL}$  mediado por la proteína-quinasa dependiente de AMPc<sup>31</sup>. Por último, la nueva mutación de pérdida de función del gen *CACNA1C* que se ha descrito podría eliminar, por supresión de la serina en la posición 1961, un posible sitio de fosforilación. La consideración de esta serina como un sitio posible de fosforilación para la cinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1) se debe a predicciones bioinformáticas (Group-based prediction System 3.0), que no se ha demostrado experimentalmente. Por lo tanto, se requieren otros estudios para determinar el mecanismo último por medio del cual la mutación causa una aceleración de la IDV de los canales Cav1.2.

### Implicaciones clínicas de los hallazgos funcionales en esta familia

Los resultados del modelo matemático confirmaron que el aumento de la  $I_{NaL}$  producido por la mutación p.R1644H de Nav1.5 podría ser el origen de la prolongación de la DPA y la duración del intervalo QT observadas en el paciente IV.1. Al contrario, la ligera disminución en la entrada de Ca durante la fase de meseta del PA cardiaco humano producido por la mutación p.S1961N del canal Cav1.2 podría compensar el aumento de la entrada de Na producido por la mutación p.R1644H del canal Nav1.5. Por consiguiente, en los miembros de la familia con ambas mutaciones, los PA ventriculares y el ECG serían «prácticamente normales». No obstante, hay que tener presente que el probando, que es portador de ambas mutaciones, sufrió un episodio sincopal cuando se hallaba en tratamiento con ciprofloxacino, un fármaco que prolonga el intervalo QT<sup>15</sup>. Además, tanto la madre como la abuela del probando, que parecerían «portadoras obligadas» de ambas mutaciones (el padre del probando no presenta ninguna de las mutaciones), sufrieron muerte súbita cardiaca. Cabe destacar que en el paciente IV.2, que también es portador de ambas mutaciones, la infusión de flecainida produjo un ensanchamiento notable del QRS e indujo un patrón electrocardiográfico parecido al del síndrome de Brugada, sin ninguna modificación en la duración del QT. En consecuencia, puede establecerse la hipótesis de que la «compensación funcional» entre mutaciones de ganancia de función y mutaciones de pérdida de función de los canales de Na y Ca se limitaría a condiciones en las que los antecedentes genéticos de los pacientes no concurren con otros factores que prolonguen la repolarización ventricular (como los fármacos, la bradicardia y las alteraciones electrolíticas) o disminuyan la excitabilidad cardiaca o acorten la duración de la fase de meseta del PA ventricular (como la flecainida). Así pues, parece que en los pacientes portadores de ambas mutaciones tanto las arritmias asociadas con taquicardia ventricular tipo *torsades de pointes* como las asociadas con síndrome de Brugada podrían haberse generado en función de distintos factores proarrítmicos.



## CONCLUSIONES

Estos resultados respaldan además la afirmación de que la penetrancia y la expresividad fenotípica variables de los síndromes arritmógenos heredados pueden atribuirse parcialmente a factores genéticos. En este contexto, el análisis funcional podría ayudar a seleccionar el tratamiento para cada miembro de la familia.

## AGRADECIMIENTOS

A Sandra Sacristán, Lorena Ondo y Paloma Vaquero por su inestimable ayuda técnica.

## FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por Fondos Europeos de Desarrollo Regional, el Ministerio de Economía y Competitividad [SAF2014-58769-P; SAF2017-88116-P], la Comunidad Autónoma de Madrid [B2017/BMD-3738], el Instituto de Salud Carlos III [PI16/00398], la Red ERA para Programas de Investigación en Enfermedades Raras (AC14/00029), las fundaciones de la Mutua Madrileña y del Banco Bilbao Vizcaya Argentaria y la Sociedad Española de Cardiología.

## CONFLICTO DE INTERESES

No se declara ninguno.

### ¿QUÉ SE SABE DEL TEMA?

- Por lo menos son 15 los genes vinculados hasta ahora con el SQT1, un síndrome arritmogénico primario que se caracteriza por un intervalo QT largo que aumenta el riesgo de muerte súbita cardiaca debida a fibrilación ventricular. El SQT1 muestra una notable expresividad fenotípica, que se ha atribuido principalmente a factores demográficos y dificulta enormemente la estratificación del riesgo en los pacientes y las decisiones terapéuticas. No obstante, en algunas familias, la expresividad variable se debe a factores genéticos y puede explicarse por la presencia de múltiples mutaciones en el mismo gen o distintos genes (heterocigosis compuesta o digénica, respectivamente) o por la presencia de polimorfismos.

### ¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Se analizó funcionalmente una mutación del gen *CACNA1C*, identificada en heterocigosis digénica en una familia española, que codifica los canales p.S1691N Cav1.2. Los resultados pusieron de relieve que esta mutación disminuía la entrada de Ca durante la fase de meseta del PA, efecto que contrarresta funcionalmente el aumento de entrada de Na producido por la mutación del gen *SCN5A* asociada con QT largo que codifica los canales p.R1644H Nav1.5. Como resultado, solo el miembro de la familia que portaba exclusivamente la mutación en el gen *SCN5A* tiene SQT1 de tipo 3. Así pues, la expresión fenotípica del SQT1 podría modularse por medio de factores genéticos, y el análisis funcional de mutaciones concurrentes podría servir para orientar un enfoque terapéutico personalizado.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2018.03.009>

## BIBLIOGRAFÍA

- Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet.* 2016;61:51-55.
- Bohnen MS, Peng G, Robey SH, et al. Molecular pathophysiology of congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev.* 2017;97:89-134.
- Savio-Galimberti E, Argenzianno M, Antzelevitch C. Cardiac Arrhythmias Related to Sodium Channel Dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2017. [http://dx.doi.org/10.1007/164\\_2017\\_43](http://dx.doi.org/10.1007/164_2017_43). Consultado 22 Feb 2018.
- Rougier JS, Abriel H. Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863:1806-1812.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martínez H, et al. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm.* 2010;7:1872-1882.
- Béziau DM, Barc J, O'Hara T, et al. Complex Brugada syndrome inheritance in a family harbouring compound SCN5A and CACNA1C mutations. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:446.
- Betzenhauser MJ, Pitt GS, Antzelevitch C. Calcium channel mutations in cardiac arrhythmia syndromes. *Curr Mol Pharmacol.* 2015;8:133-142.
- Dumaine R, Wang Q, Keating MT, et al. Multiple mechanisms of Na<sup>+</sup> channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res.* 1996;78:916-924.
- Caballero R, Utrilla RG, Amorós I, et al. Tbx20 controls the expression of the KCNH2 gene and of hERG channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114:E416-E425.
- Núñez L, Barana A, Amorós I, et al. p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm.* 2013;10:264-272.
- Dolz-Gaitón P, Núñez M, Núñez L, et al. Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a Spanish family. *PLoS One.* 2013;8:1-15.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-424.
- Matamoros M, Pérez-Hernández M, Guerrero-Serna G, et al. Nav1.5 N-terminal domain binding to  $\alpha$ 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res.* 2016;110:279-290.
- O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy A, Rudy Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput Biol.* 2011;7:e1002061.
- Tamargo J. Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol.* 2000;83:1-19.
- Wang DW, Yazawa K, George AL, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na<sup>+</sup> channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:13200-13205.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 2000;102:1178-1185.
- Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation.* 2009;120:1752-1760.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron.* 1999;22:549-558.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. Executive summary: HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Heart Rhythm.* 2013;10:e85-e108.
- Napolitano C, Novelli V, Francis MD, Priori SG. Genetic modulators of the phenotype in the long QT syndrome: state of the art and clinical impact. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;33:17-24.
- Poelzing S, Forleo C, Samodell M, et al. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation.* 2006;114:368-376.
- Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest.* 2003;111:341-346.
- Clatot J, Ziyadeh-Isleem A, Maugeyre S, et al. Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5  $\alpha$ -subunits. *Cardiovasc Res.* 2012;96:53-63.
- Remme CA, Wilde AA, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:78-87.
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA.* 2005;294:2975-2980.
- Frustaci A, Priori SG, Pieroni M, et al. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation.* 2005;112:3680-3687.
- Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW. L-type Cav1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev.* 2014;94:303-326.
- Tandan S, Wang Y, Wang TT, et al. Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Circ Res.* 2009;105:51-60.
- Cohen-Kutner M, Yahalom Y, Trus M, Atlas D. Calcineurin Controls Voltage-Dependent-Inactivation (VDI) of the Normal and Timothy Cardiac Channels. *Sci Rep.* 2012;2:366.
- Hall DD, Feekes JA, Arachchige. et al. Binding of protein phosphatase 2 A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation. *Biochemistry.* 2006;45:3448-3459.