

Artículo original

Rasgos no ventriculares, clínicos y funcionales de la mutación RyR2^{R420Q} causante de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica



Diana Domingo^a, Patricia Neco^b, Elena Fernández-Pons^c, Spyros Zissimopoulos^d, Pilar Molina^e, José Olagüe^a, M. Paz Suárez-Mier^f, F. Anthony Lai^d, Ana M. Gómez^b y Esther Zorio^{a,*}

^a Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

^b Inserm, U769, Université de Paris Sud, IFR141, LabEx Lermite, Châtenay-Malabry, Francia

^c Grupo de Investigación acreditado de Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascul, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

^d Wales Heart Research Institute, Cardiff University School of Medicine, Cardiff, Reino Unido

^e Servicio de Histopatología, Instituto de Medicina Legal, Valencia, España

^f Servicio de Histopatología, Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid, España

Historia del artículo:

Recibido el 22 de noviembre de 2013

Aceptado el 28 de abril de 2014

On-line el 29 de noviembre de 2014

Palabras clave:

Calcio
Muerte súbita
Canales iónicos
Receptor 2 de rianodina
Genética
Electrocardiografía

RESUMEN

Introducción y objetivos: La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica es una enfermedad maligna que se debe a mutaciones en las proteínas que controlan la homeostasis del Ca²⁺. Aunque el fenotipo se caracteriza por arritmias ventriculares polimórficas desencadenadas por el estrés, no se han caracterizado plenamente las arritmias supraventriculares que en ocasiones las acompañan.

Métodos: Veinticinco miembros de una familia española en la que había habido varias muertes súbitas fueron evaluados mediante electrocardiograma, pruebas de esfuerzo y prueba de desensibilización con adrenalina opcionalmente. Se realizó secuenciación selectiva de RyR2 en un miembro afectado y un cribado en cascada al resto de la familia. Se generó la mutación RyR2^{R420Q} en células HEK-293 mediante mutagénesis dirigida, con objeto de realizar estudios funcionales *in vitro*.

Resultados: Las pruebas de esfuerzo desmascaron taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica en 8 familiares (sensibilidad del 89%; valor predictivo positivo del 100%; valor predictivo negativo del 93%), todos ellos portadores de una mutación heterocigota RyR2^{R420Q}, que estaba presente también en el caso probando y en una chica joven sin prueba de esfuerzo, lo que corresponde a una penetrancia del 91% al final del seguimiento. Es de destacar que en los pacientes se identificó bradicardia sinusal, arritmias auriculares y de la unión y/u ondas U gigantes tras esfuerzo. Tras la liberación de Ca²⁺ menor que el de las células RyR2 no mutado o *wild-type*. Sin embargo, a una concentración de Ca²⁺ intracelular fisiológica, equivalente a la concentración citosólica diastólica, las células RyR2^{R420Q} liberaban más Ca²⁺ y oscilaban con mayor rapidez que las células con RyR2 no mutado o *wild-type*.

Conclusiones: La mutación *missense* RyR2^{R420Q} se identificó en el extremo aminoterminal del gen RyR2 en esta familia muy sintomática. Es de destacar que esta mutación se asocia a bradicardia sinusal, arritmias auriculares y de la unión y ondas U gigantes. En conjunto, los estudios de expresión heteróloga funcional indican que la mutación RyR2^{R420Q} causa un comportamiento aberrante del canal, con pérdida o ganancia de función, según cuál sea la concentración de Ca²⁺ intracelular citosólica.

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Non-ventricular, Clinical, and Functional Features of the RyR2^{R420Q} Mutation Causing Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia

ABSTRACT

Introduction and objectives: Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is a malignant disease, due to mutations in proteins controlling Ca²⁺ homeostasis. While the phenotype is characterized by polymorphic ventricular arrhythmias under stress, supraventricular arrhythmias may occur and are not fully characterized.

Methods: Twenty-five relatives from a Spanish family with several sudden deaths were evaluated with electrocardiogram, exercise testing, and optional epinephrine challenge. Selective RyR2 sequencing in an affected individual and cascade screening in the rest of the family was offered. The RyR2^{R420Q} mutation was generated in HEK-293 cells using site-directed mutagenesis to conduct *in vitro* functional studies.

Keywords:

Calcium
Sudden death
Ion channels
Ryanodine receptor-2
Genetics
Electrocardiography

* Autor para correspondencia: Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Torre F 4.ª planta, Bulevar Sur s/n, 46026 Valencia, España. Correo electrónico: zorio_est@gva.es (E. Zorio).

Results: The exercise testing unmasked catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in 8 relatives (sensitivity = 89%; positive predictive value = 100%; negative predictive value = 93%), all of them carrying the heterozygous RyR2^{R420Q} mutation, which was also present in the proband and a young girl without exercise testing, a 91% penetrance at the end of the follow-up. Remarkably, sinus bradycardia, atrial and junctional arrhythmias, and/or giant post-effort U-waves were identified in patients. Upon permeabilization and in intact cells, the RyR2^{R420Q} expressing cells showed a smaller peak of Ca²⁺ release than RyR2 wild-type cells. However, at physiologic intracellular Ca²⁺ concentration, equivalent to the diastolic cytosolic concentration, the RyR2^{R420Q} released more Ca²⁺ and oscillated faster than RyR2 wild-type cells.

Conclusions: The missense RyR2^{R420Q} mutation was identified in the N-terminus of the RyR2 gene in this highly symptomatic family. Remarkably, this mutation is associated with sinus bradycardia, atrial and junctional arrhythmias, and giant U-waves. Collectively, functional heterologous expression studies suggest that the RyR2^{R420Q} behaves as an aberrant channel, as a loss- or gain-of-function mutation depending on cytosolic intracellular Ca²⁺ concentration.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

AV: arritmias ventriculares

PE: pruebas de esfuerzo

TVPC: taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

INTRODUCCIÓN

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) causa un 12-56% de las muertes súbitas cardíacas o paradas cardiorrespiratorias con corazón estructuralmente normal^{1,2}. La TVPC se manifiesta en forma de síncope o muerte súbita cardíaca desencadenados por estados adrenérgicos, con una penetrancia estimada del 80%³. El electrocardiograma en reposo es generalmente normal y los pacientes presentan arritmias ventriculares (AV) durante las pruebas de esfuerzo (PE) o la infusión de catecolaminas^{1,4}. La patogenia y la prevalencia real de las arritmias no ventriculares (como la disfunción sinusal, el marcapasos auricular errante, las arritmias de la unión y la fibrilación y flutter auriculares) que se ha descrito ocasionalmente en los pacientes con TVPC continúan sin estar claras^{3,5-9}.

Las mutaciones suelen afectar al gen que codifica el receptor de rianodina cardíaco (RyR2), pero otros genes se han involucrado también en la patogenia de esta enfermedad¹⁰⁻¹⁴. El control anormal de la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) promueve un aumento de la liberación diastólica de Ca²⁺, que genera a su vez pospotenciales tardíos y con ello actividad desencadenada que es la base fisiopatológica de las AV en esta enfermedad^{3,15}. Sin embargo, los mecanismos precisos involucrados podrían diferir según la mutación específica existente en cada caso en la proteína RyR2¹⁶⁻¹⁸. Se presenta aquí la caracterización exhaustiva de una familia amplia con TVPC, haciendo hincapié en las manifestaciones electrocardiográficas de la enfermedad. Además, se presenta el estudio funcional *in vitro* que analiza el mecanismo de la disfunción del canal RyR2^{R420Q}.

MÉTODOS

En una familia con 4 casos de muerte súbita, se llevó a cabo una evaluación familiar con un protocolo acorde con lo establecido en la Declaración de Helsinki y aprobado previamente por el comité de ética de investigación local. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos.

Estudio diagnóstico clínico

El estudio diagnóstico en el individuo III:10 incluyó electrocardiograma, ecocardiografía, obtención de muestras de sangre y PE con ejercicio máximo (protocolo de Bruce). Una vez diagnosticado el fenotipo de TVPC durante la PE en este individuo, se ofreció un cribado en cascada a los demás miembros de la familia, que incluyó un test de adrenalina en los adultos con una PE no diagnóstica de TVPC que eran hijos de un individuo afectado. Se registró el cociente entre la amplitud máxima de onda U respecto a la onda T en esfuerzo. La bradicardia sinusal se definió como una frecuencia cardíaca < 60 lpm por encima de los 14 años de edad o inferior al percentil 2 ajustado respecto a la edad para los niños más pequeños⁷. La TVPC se diagnosticó en los casos en los que se producía una muerte súbita cardíaca, AV polimórfica o extrasístoles ventriculares frecuentes (> 10/min) durante una PE o un test de adrenalina (fenotipo+)¹⁹.

Estudio diagnóstico genético

Se obtuvo ADN de muestras de sangre total (familiares) o de muestras de miocardio incluidas en parafina (probando). El análisis genético selectivo de RyR2 (secuenciación directa de los exones 3, 8, 14, 15, 37, 44-50, 83, 87-105, y regiones intrónicas adyacentes, acceso a GenBank número NM_001035) con un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) en el individuo III:10 identificó la mutación RyR2^{R420Q} en el exón 14, y en los demás familiares se secuenció únicamente dicho fragmento (se consideró genotipo+ a los portadores de la mutación). Dado que el síndrome de Andersen Tawil, debido a mutaciones del gen *KCNJ2*, se caracteriza por un QTc normal o casi normal, ondas U gigantes y AV relacionadas con ejercicio polimórficas, se secuenció también este gen en los individuos con TVPC.

Generación de constructos de RyR2 no mutado o wild-type y RyR2^{R420Q}

Se realizó una mutagénesis dirigida de RyR2 para crear el constructo RyR2^{R420Q}²⁰. De forma resumida, se utilizó un plásmido que codificaba el extremo aminoterminal de la RyR cardíaca humana (Genbank X98330) para la mutagénesis dirigida (Stratagene, ChickChange kit) empleando el oligonucleótido 5'-CAGCCC-GAGTTATCCAGACACAGTCTTCC-3'. El constructo final pRyR^{R420Q} se generó con la digestión de *SanDI/SpeI* y se introdujo en un pCDNA3 (Invitrogen) que contenía la proteína RyR2 completa marcada con fluorescencia verde.

Análisis de Western blot

Se realizó una transfección en células HEK-293 (*European Collection of Cell Culture Agency*, Salisbury, Reino Unido)²⁰⁻²². Las fracciones proteicas (100 µg) se resuspendieron en tampón de carga de SDS-PAGE, y las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE al 4% reforzado con agarosa al 0,5% (para la RyR)²¹. Las proteínas procedentes de los geles al 4% se transfirieron electroforéticamente a una membrana de polivinilidendifluoruro (Immobilon-P, Millipore) utilizando un sistema de transferencia semiseco (Trans-Blot SD, Bio-Rad) a 22 V durante 4 h. Se aplicó un anticuerpo primario específico para la isoforma de RyR2 (Ab1093, anticuerpo policlonal de conejo generado contra los residuos 4454-4474 de la RyR2) a una dilución de 1:1.000 durante una noche a 4 °C. Se visualizaron las bandas de proteínas inmunorreactivas mediante una detección de quimioluminiscencia intensificada (ECL, Amersham Biosciences).

Técnica de imagen del Ca²⁺ intracelular

Las células HEK-293 se sembraron en placas de Petri de fondo de vidrio recubiertas de polilisina D (MatTek; Ashland, Estados Unidos) y se realizó una transfección con plásmidos de RyR2 no mutado o *wild-type* (RyR2^{WT}) y RyR2^{R420Q} marcados con fluorescencia^{20,22}. Se permeabilizaron las células para el control de la concentración de [Ca²⁺]_i con saponina (0,01%)¹². La solución interna contenía (mmol/l): K-aspartato, 120; HEPES, 10; MgATP, 2; EGTA, 0,5; Na fosfocreatina, 10; creatincinasa, 5 U/ml; MgCl₂, 0,75; dextrano, 8%; saponina (0,01%), pH 7,2. Tras la permeabilización, se perfundieron las células con la misma solución interna sin saponina, pero con 15 µM de sal fluo-4-pentapotasio y la [Ca²⁺]_i conocida (10⁻¹ – 10⁵ nM) que se obtuvo empleando diferentes cocientes de CaCl₂:EGTA calculados con el Maxchelator²³. La concentración de EGTA se mantuvo constante en 0,5 mM. Dado que las células HEK-293 no son excitables, se activó la RyR2 con cafeína 5 mM y se registraron las [Ca²⁺]_i resultantes por microscopio confocal (Zeiss LSM 510, objetivo de inmersión en agua ×63, apertura numérica, 1,2) a 394 ms/fotograma. Se realizaron también experimentos en células HEK-293 intactas según lo descrito para otros constructos de RyR2^{24,25}. En este caso, las células se cargaron con fluo-4 AM (éster acetoximetilo). Luego se perfundieron las células con una solución externa que contenía (Mm): NaCl, 150; KCl, 5,4; CaCl₂, 1,5; MgCl₂, 1; glucosa, 10; ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanosulfónico, 5 (pH 7,4).

Se registraron las oscilaciones espontáneas de la [Ca²⁺]_i empleando microscopio confocal. Tanto en las células permeabilizadas como en las intactas, se provocó la excitación de fluorescencia de fluo-4 con un láser de Ar (488 nm) y se registró la emisión de fluorescencia > 505 nm. El análisis de las imágenes se realizó con el programa informático Zeiss LSM 510 v2.8. Se aplicó una sustracción de la fluorescencia de fondo de proteína fluorescente verde intensificada. Los valores de F (fluorescencia) se normalizaron para la F₀ (fluorescencia basal, determinada antes de aplicar la cafeína o entre dos oscilaciones) con objeto de obtener el cociente de fluorescencia (F/F₀).

Análisis estadístico

Las variables clínicas continuas se expresan en forma de media ± desviación estándar; las variables de laboratorio continuas, en forma de media ± error estándar de la media, y se utilizaron pruebas de la t de Student para la comparación de los grupos. Las variables dicotómicas se expresan en forma de porcentajes y se aplicó la prueba de la χ^2 para la comparación de los grupos (con corrección exacta de Fisher cuando era aplicable). Un valor de p bilateral < 0,05 se consideró estadísticamente significativo. En los análisis, se utilizó el programa informático SPSS 12.0 (SPSS, Inc.; Chicago, Illinois, Estados Unidos).

RESULTADOS

Antecedentes familiares de muerte súbita cardiaca

El probando (figura 1, III:8), un varón de 14 años con antecedentes de síncope de esfuerzo inexplicados, sufrió una muerte súbita relacionada con la práctica deportiva, y el examen *post mórtem* no identificó alteraciones. Otros tres familiares habían fallecido de forma súbita siendo jóvenes (uno de ellos, el individuo II:2, durante el ejercicio y con un síncope previo inexplicado), pero no se realizó autopsia a ninguno de ellos.

Evaluación familiar: fenotipo de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica y genotipo RyR2

Quince años después del evento inicial, se llevó a cabo la evaluación de 25 familiares vivos del probando (tabla). Se descartó

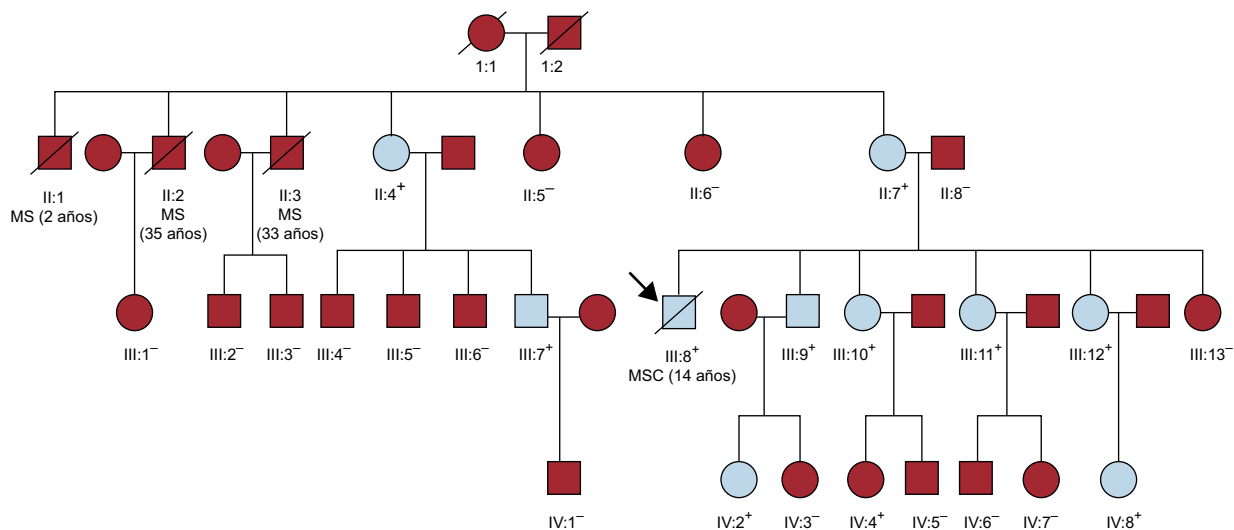


Figura 1. Árbol genealógico familiar. Cuadrados: varones. Círculos: mujeres. Símbolos tachados: individuos fallecidos. Símbolos azules; taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica fenotipo+ (con muerte súbita cardiaca o arritmias ventriculares relacionadas con el esfuerzo) al final del seguimiento. La flecha señala el caso probando inicial. Los signos más y menos indican individuos positivos y negativos para la mutación respectivamente. MS: muerte súbita, sin autopsia; MSC: muerte súbita cardiaca, sin enfermedad estructural en la autopsia. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

Tabla
Estudio diagnóstico familiar inicial

Miembro de la familia	Edad en la primera evaluación	BB en la primera evaluación	Edad primer-último síncope, desencadenantes	Arritmias	U/Tex	ADR	Grupo
II:4	57 años	Sí	12-47 años, ejercicio y emociones	BS, AV, TA/TU	0,13	NR	F+G+
II:5	64 años	No	Sin síncope	No	0,00	NR	F-G-
II:6	51 años	No	Sin síncope	No	0,00	NR	F-G-
II:7	68 años	Sí	9-55 años, ejercicio y emociones	BS, AV, TA/TU	0,14	NR	F+G+
II:8	74 años	No	Sin síncope	FA	0,00	NR	F-G-
III:1	34 años	No	12-30 años, sin desencadenantes	No	0,00	-	F-G-
III:2	24 años	No	Sin síncope	No	0,00	-	F-G-
III:3	30 años	No	Sin síncope	No	0,00	-	F-G-
III:4	36 años	No	Sin síncope	BS	0,32	-*	F-G-
III:5	33 años	No	Sin síncope	BS	0,28	-	F-G-
III:6	23 años	No	Sin síncope	BS	0,15	-	F-G-
III:7	29 años	No	28 años, emociones	BS, AV, TA/TU	0,33	NR	F+G+
III:8	14 años a la MSC	No	6 años, ejercicio	NR	NR	NR	F+G+
III:9	49 años	No	Sin síncope	BS, AV, TA/TU	0,28	NR	F+G+
III:10	35 años	No	11 años, ejercicio y emociones	BS, AV, TA/TU	0,31	NR	F+G+
III:11	44 años	No	30 años, ejercicio	BS, AV, TA/TU	0,35	NR	F+G+
III:12	39 años	No	20 años, ejercicio y emociones	AV	0,21	NR	F+G+
III:13	47 años	No	Sin síncope	No	0,14	-	F-G-
IV:1	Desconocida/3 meses	No	Sin síncope	NR	0,00	NR	F?G-
IV:2	21 años	No	18 años, ejercicio y emociones	BS, AV, TA/TU	0,26	NR	F+G+
IV:3	12 años	No	Sin síncope	No	0,28	NR	F-G-
IV:4	Desconocida/2 años	No	Sin síncope	NR	0,00	NR	F?G+
IV:5	Desconocida/2 meses	No	Sin síncope	NR	NR	NR	F?G-
IV:6	17 años	No	Sin síncope	No	0,14	NR	F-G-
IV:7	12 años	No	Sin síncope	No	0,05	NR	F-G-
IV:8	7 años	No	Sin síncope	No*	0,00	NR	F-G+

+: positivo; -: negativo; ?: desconocido; ADR: provocación de adrenalina; AV: arritmias ventriculares; BB: bloqueadores beta; BS: bradicardia sinusal; F: fenotipo taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica; G: genotipo RyR2^{R420Q}; MSC: muerte súbita cardiaca; NR: no realizado; PE: pruebas de esfuerzo; TA/TU: taquiarritmias auriculares y/o de la unión; U/Tex: cociente entre la amplitud máxima de onda U respecto a la onda T en esfuerzo.

* Presentó arritmias ventriculares a los 2 años de seguimiento (mujer, fenotipo taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica positivo, genotipo RyR2^{R420Q} positivo).

la presencia de una cardiopatía estructural con una ecocardiografía ordinaria y, en el caso del paciente III:10, también con una resonancia magnética cardiaca. No se pudo evaluar con una PE ordinaria a 3 de los familiares debido a su corta edad (fenotipo desconocido). Solo uno (IV:4) de ellos presentó genotipo+, y la monitorización electrocardiográfica no mostró ninguna AV (ni en la evaluación inicial sin fármacos a los 2 años de edad ni con bloqueadores beta en dosis ajustadas al peso a los 4 años de edad). En los 22 familiares restantes, la PE permitió establecer el diagnóstico clínico de TVPC en 8 de ellos (fenotipo+). En la PE se observó, de manera característica, que tras un aumento variable de la frecuencia cardiaca aparecían progresivamente extrasístoles ventriculares a un umbral medio de frecuencia cardiaca de 103 ± 24 (62-130) lpm, primero aisladas y monomórficas y luego con bigeminismo, polimórficas, en dobletes y también en salvas de taquicardia ventricular polimórfica no sostenida en el 50% de los individuos con fenotipo+ a un umbral medio de frecuencia cardiaca de 121 ± 10 (109-131) lpm. Finalmente, las extrasístoles ventriculares desaparecían progresivamente durante el periodo de recuperación. Tan solo un individuo presentó una taquicardia ventricular

bidireccional. Es de destacar que estas arritmias no fueron en ningún caso sostenidas ni se asociaron a síncope (figura 2). De los 13 individuos en riesgo, el test de adrenalina fue negativo en 7, lo cual concuerda con los anteriores resultados negativos de sus PE, y se desestimó en 4 niños (IV:3 y IV:6-8) y 2 adultos (II:5 y II:6), a la espera de los resultados genéticos.

Se identificó una mutación *missense* heterocigota en RyR2 (1259 G>A, R420Q) en el individuo III:10. El cribado en cascada para esa mutación identificó a un total de 11 individuos con genotipo+: los 8 con fenotipo+, una joven con fenotipo- (IV:8), una joven de fenotipo desconocido (IV:4) y también el probando inicial (III:8). Todos los familiares fueron clasificados según su fenotipo y su genotipo (+, - o desconocido) (tabla). No se identificaron mutaciones de KCNJ2.

Considerando como pacientes a los portadores de mutación, la PE en la primera evaluación mostró una sensibilidad del 89%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 93%. La única PE con un resultado falso negativo se produjo en una niña de 7 años de edad con genotipo+ (IV:8) asintomática que presentó una conversión a fenotipo+ pese a usar bloqueadores beta

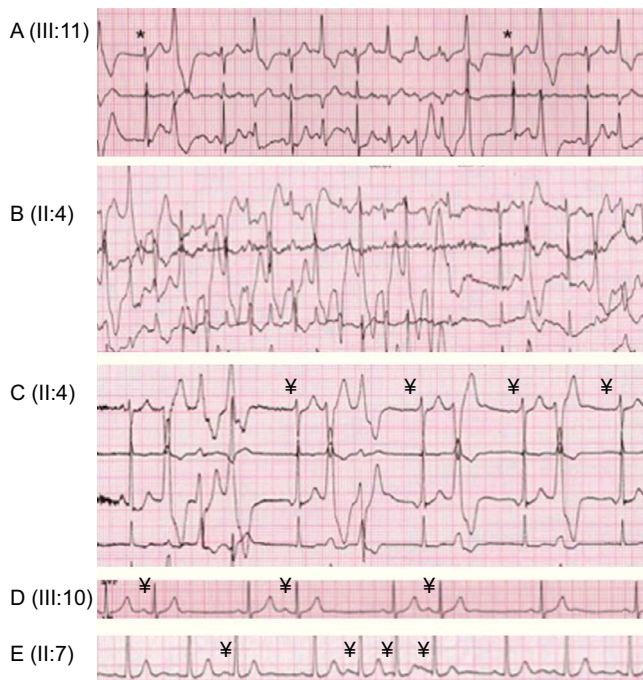


Figura 2. Arritmias ventriculares y no ventriculares durante las pruebas de esfuerzo. A: bigeminismo ventricular monomórfico y salvos de taquicardia ventricular polimórfica no sostenida (*escape de la unión). B: taquicardia ventricular no sostenida bidireccional. C: extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular polimórfica no sostenida, doblete ventricular polimórfico, bigeminismo ventricular monomórfico y ritmo auricular ectópico (¥). D: bigeminismo auricular (¥). E: extrasístoles auriculares aisladas y en salvos (¥).

2 años después. Por consiguiente, el rendimiento general de la PE aumentó a hasta un 100%. La penetrancia de la enfermedad aumentó del 82 al 91% al final del seguimiento, al considerar los resultados clínicos (síncope y/o muerte súbita cardiaca) y de la PE

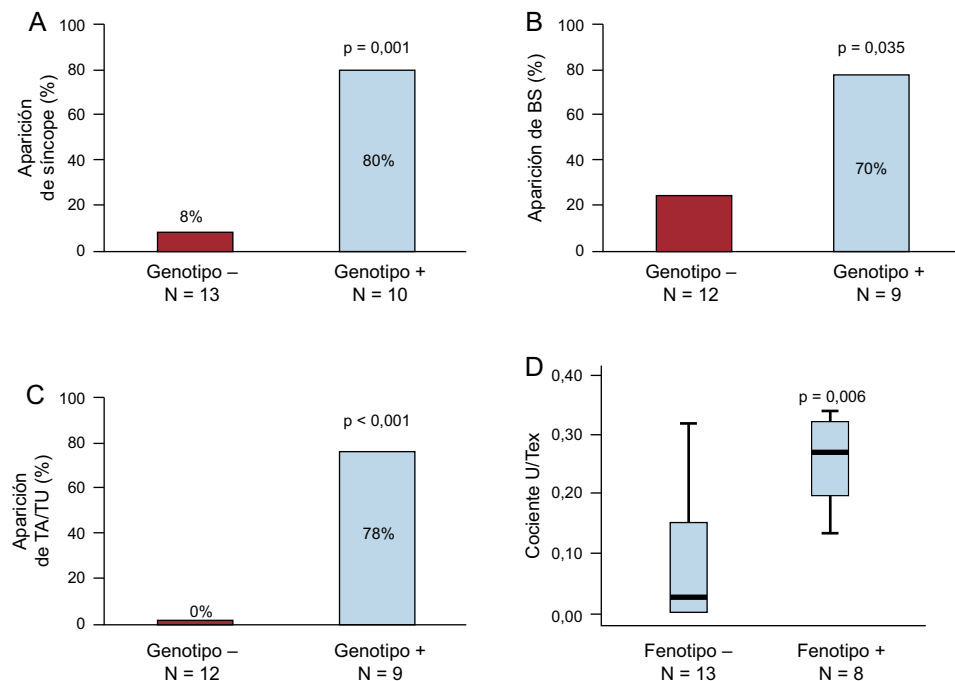


Figura 3. Manifestaciones clínicas. A: aparición de síncope; no se tuvo en cuenta a los niños de edad inferior a la del primer síncope de la familia, es decir, 6 años. B: aparición de bradicardia sinusal. C: arritmias auriculares y de la unión. D: comparación del cociente entre la amplitud máxima de onda U respecto a la onda T en esfuerzo según el fenotipo; para B-D, solamente se consideró a los individuos en ritmo sinusal y con pruebas de esfuerzo disponibles. +: positivo; -: negativo; BS: bradicardia sinusal; TA/TU: taquiarritmias auriculares y/o de la unión; U/Tex: cociente entre la amplitud máxima de onda U respecto a la onda T en esfuerzo.

en los pacientes con genotipo+. Es de destacar que la aparición de síncope se asoció al estado de portador de mutación en los individuos evaluables > 6 años de edad (8 síncope desencadenados con estrés/10 pacientes con genotipo+ frente a 1 síncope sin desencadenante estresante previo/13 individuos de genotipo-; $p = 0,001$) (tabla, figura 3A).

Otras manifestaciones electrocardiográficas

Se identificaron arritmias sinusales, auriculares, de la unión y AV en los pacientes con TVPC tanto en los electrocardiogramas en reposo como en los obtenidos durante el ejercicio. De los individuos evaluables (edad > 6 años, en ritmo sinusal y con una PE disponible), se recogieron las arritmias no ventriculares ($n = 21$; 9 genotipo+, 12 genotipo negativo). Se observó que la incidencia de bradicardia sinusal era superior (tabla, figura 3B) en los pacientes con genotipo+ que entre los de genotipo- (el 78 frente al 25%; $odds\ ratio = 10,5$; $p = 0,030$). Las taquiarritmias auriculares y/o de la unión incluyeron extrasístoles auriculares, bigeminismo auricular, taquicardia auricular no sostenida, ritmo acelerado auricular y de la unión y ritmo de escape de la unión. Se detectaron taquiarritmias auriculares y/o de la unión en 7 de 9 pacientes con genotipo+ y en ninguno de genotipo- (tabla, figura 3C). El cociente entre la amplitud máxima de onda U respecto a la onda T en esfuerzo fue significativamente superior en los individuos con fenotipo+ que entre los de fenotipo- (figura 3D). Aunque el solapamiento de los datos impidió la identificación de un punto de corte exacto. Es de destacar que se observaron ondas U gigantes tras ejercicio en varios pacientes con TVPC (figura 4). No se detectaron ondas U alternantes ni cambios de polaridad de la onda U postextrasistólica.

Tratamiento y seguimiento

Se alcanzó la dosis máxima tolerada de bloqueadores beta en los individuos con genotipo+. Se implantaron cinco desfibriladores automáticos a pacientes con fenotipo+ que presentaban AV frecuentes a pesar del tratamiento con bloqueadores beta máximo

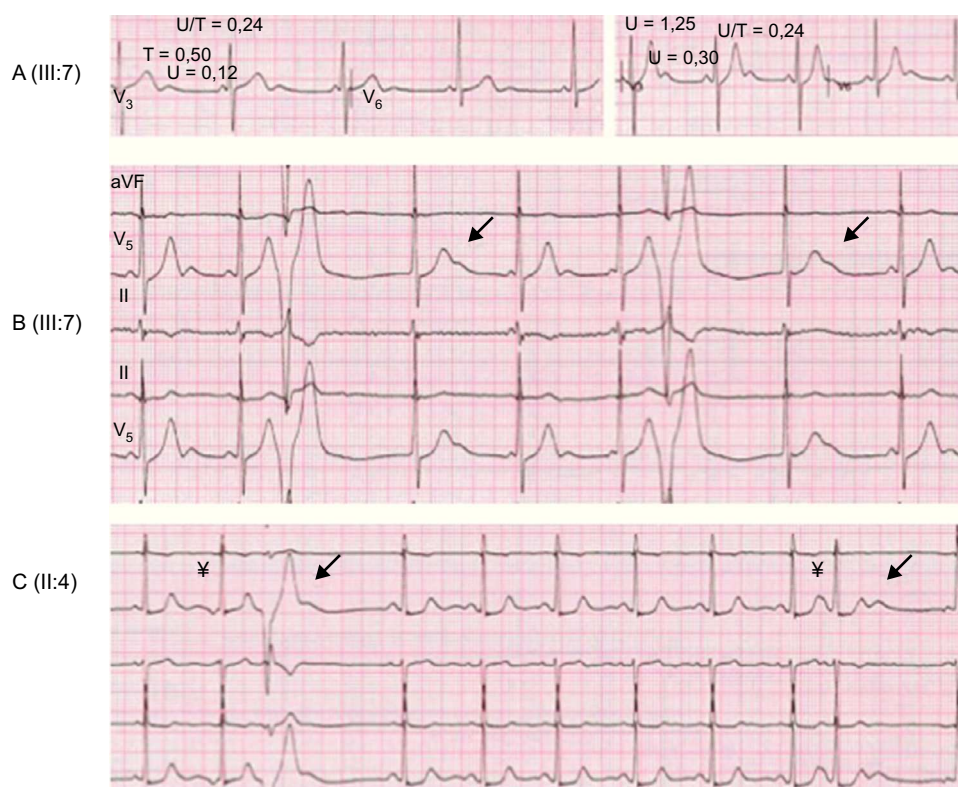


Figura 4. Características de la onda U en los pacientes con taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. A: onda U en reposo (izquierda) y tras ejercicio (derecha); un intervalo PR corto y fijo indica una conducción auriculoventricular acelerada (izquierda). B: aumento transitorio de la amplitud de la onda U en el primer latido tras una extrasístole ventricular (flechas) en ejercicio; un ritmo de la unión compite con un ritmo sinusal. C: aumento transitorio de la amplitud de la onda U con el ejercicio, asociado a extrasístoles auriculares (flecha de la derecha) o ventriculares (flecha de la izquierda).

(uno de ellos, el individuo IV:2, presentaba también presíncope desencadenados por estrés). En ese momento, no había todavía publicaciones respecto al papel de la flecainida en la TVPC⁴. Desde ese momento no se ha registrado en la evolución ninguna descarga de los desfibriladores automáticos (media de seguimiento, 23,3 meses).

Modelo celular de RyR2^{R420Q} *in vitro*

Con objeto de verificar si había una alteración de la función del canal RyR2^{R420Q}, se generó la mutación y se expresó en células HEK-293 (figura 5A). Las proteínas inmunorreactivas específicas de RyR2 expresadas se localizaron en la membrana del retículo sarcoplásmico (figura 5B). En la figura 5C se muestran ejemplos de imágenes confocales de células HEK-293 permeabilizadas con expresión de RyR2^{WT} y RyR2^{R420Q} tras la adición de cafeína a $[Ca^{2+}]_i$ $10^{-7.5}$ M. Además, las imágenes registradas de los perfiles de fluorescencia a diversas $[Ca^{2+}]_i$ se representan gráficamente en la figura 5D. La liberación de Ca^{2+} tanto con RyR2^{WT} como con RyR2^{R420Q} mostró una curva en forma de campana al representarla gráficamente en función de la $[Ca^{2+}]_i$ citosólica, con una reducción del 34% en el pico de liberación de Ca^{2+} en las células con expresión de RyR2^{R420Q} (figura 5E) a una pCa 7,5. Se descartó que un grado diferente de expresión de RyR2 en cada grupo celular para explicar esta observación al determinar una fluorescencia de la proteína RyR2 marcada con fluorescencia verde similar en las células RyR2^{WT} y RyR2^{R420Q} (F, en unidades arbitrarias, $50,4 \pm 1,6$ en 195 células RyR2^{WT} frente a $50,1 \pm 1,5$ en 241 células con expresión de RyR2^{R420Q}; sin diferencias significativas). Sin embargo, al valor más bajo de pCa evaluado, se observó un aumento significativo de la liberación de Ca^{2+} provocada por cafeína en las células RyR2^{R420Q} (pCa, 10,5) (figuras 5D y E). Para calcular la EC₅₀ (half maximal effective

concentration) para la curva de activación de Ca^{2+} y la IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) para la curva de inactivación del Ca^{2+} , se normalizó la fluorescencia causada por cafeína respecto a su máximo, que resultó suceder a la misma $[Ca^{2+}]_i$ (pCa, 7,5) en ambos grupos (figura 5F). La EC₅₀ fue inferior en las RyR2^{R420Q} que en las RyR2^{WT} ($2,66 \pm 0,13$ en las RyR2^{R420Q} frente a $4,98 \pm 5,15$ nM en las RyR2^{WT}; sin diferencias significativas). A una $[Ca^{2+}]_i$ superior, RyR2 se inactivó con un patrón similar, según lo observado en la parte descendente de las curvas ajustadas (IC₅₀, $365,5 \pm 50,5$ en RyR2^{WT} frente a $339,5 \pm 58,4$ nM en RyR2^{R420Q}; sin diferencias significativas).

Las células HEK-293 intactas con transfección con plásmidos de RyR2^{WT} o RyR2^{R420Q} se utilizaron para analizar las oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ (figuras 6A y B). Es interesante señalar que, a $[Ca^{2+}]_o$ fisiológicas (1,5 mM) $[Ca^{2+}]_i$, las oscilaciones registradas en las células RyR2^{R420Q} fueron de menor amplitud (figura 6C), de menor duración ($7,6 \pm 0,5$ ms en 51 células RyR2^{WT} frente a $5,9 \pm 0,5$ ms en 40 células RyR2^{R420Q}; $p < 0,05$), y tuvieron una duración del ciclo mayor que las oscilaciones de las células RyR2^{WT} (figura 6D). Es llamativo que estas alteraciones no se debieran a una disminución de la carga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, que de hecho fue similar en los dos grupos de células (F/F₀, $3,8 \pm 0,3$ en 15 células frente a $3,6 \pm 0,3$ en 13 células RyR2^{R420Q}; sin diferencias significativas). En un grupo de células, registramos primero las oscilaciones espontáneas a 1,5 mM $[Ca^{2+}]_o$ y luego redujimos la $[Ca^{2+}]_o$ a 0,1 mM $[Ca^{2+}]_o$. Esta maniobra produjo una supresión de la actividad automática en un porcentaje de las células HEK-293 superior en las RyR2^{WT} que en las RyR2^{R420Q}, reflejado en una frecuencia superior (o menor duración del ciclo) de las oscilaciones espontáneas (figura 6E) y un porcentaje más alto de células con expresión de RyR2^{R420Q} que mostraban oscilación (figura 6F), todo ello en consonancia con los resultados de este estudio en las células permeabilizadas a los valores más bajos de $[Ca^{2+}]_i$ analizados.

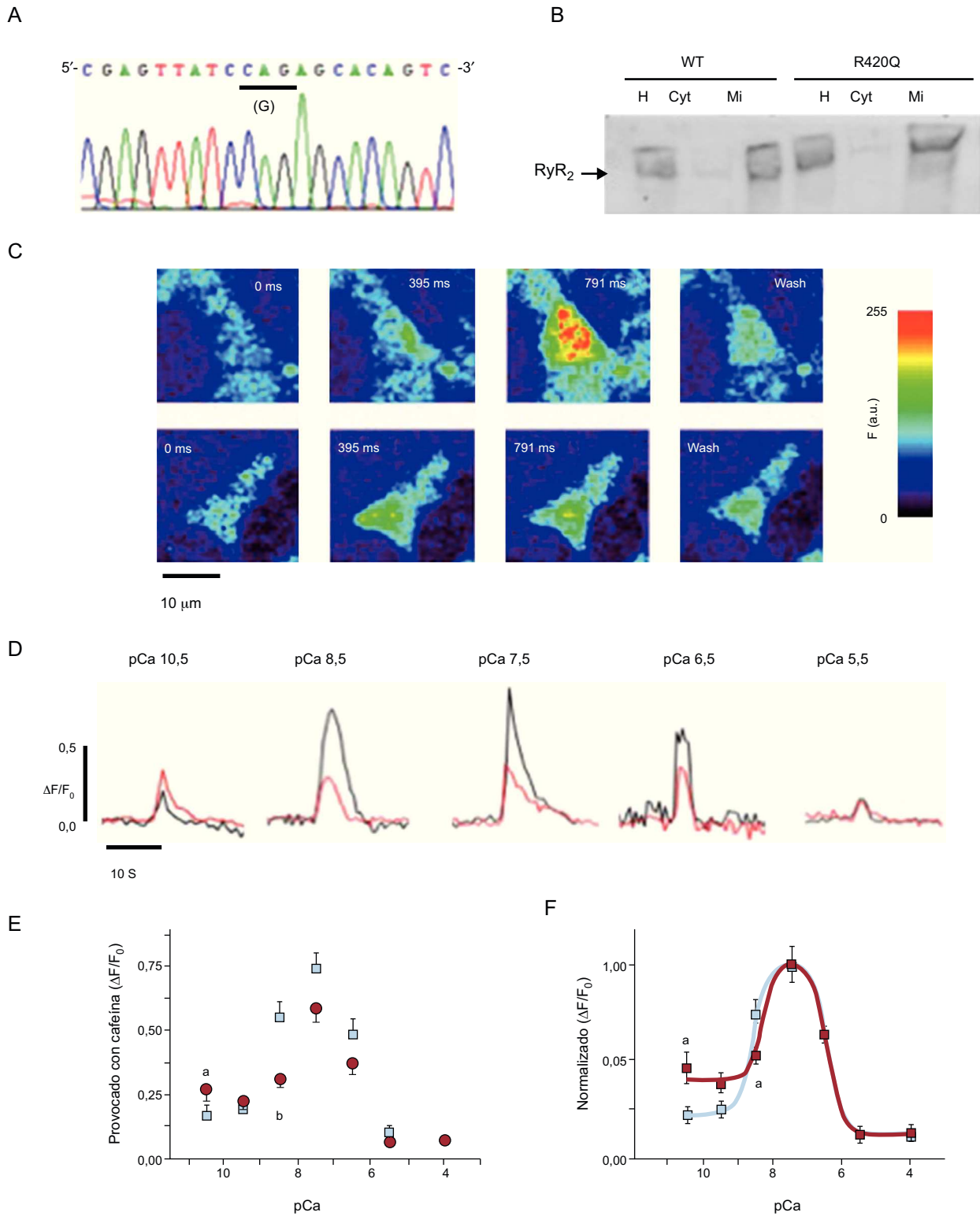


Figura 5. Evaluación funcional *in vitro* de la mutación RyR2^{R420Q}. A: electroferograma que confirma la introducción del punto de mutación G1380A que da lugar a la conversión de arginina (A) a glutamina (G), RyR2^{R420Q}, en el constructo del plásmido. B: análisis *Western blot* de RyR2 procedente de células HEK-293 transfectadas que confirma que las proteínas RyR2^{WT} y RyR2^{R420Q} se expresan en el homogeneizado y en las fracciones microsomales, pero no en el citosol. La flecha señala la banda de 595 kDa (RyR2 marcada con proteína fluorescente verde intensificada). C: imágenes confocales de los cambios del calcio en células HEK-293 permeabilizadas que expresan RyR2^{WT} (arriba) y RyR2^{R420Q} (abajo) y sumergidas en una solución interna con un contenido de [Ca²⁺]_i = 10^{-7.5} M y cafeína 5 mM. D: ejemplos representativos de perfiles de fluorescencia obtenidos de células HEK-293 permeabilizadas con expresión de RyR2^{WT} (negro) y RyR2^{R420Q} (rojo) y sumergidas en soluciones que contienen diferentes [Ca²⁺]_i y estimuladas con cafeína 5 mM. E: promedio de liberación de calcio inducida por cafeína (valores máximos normalizados para el cociente de fluorescencia basal) en las células HEK-293 con expresión de RyR2^{WT} (cuadrados) y RyR2^{R420Q} (círculos) a diversas [Ca²⁺]_i; los datos se expresan en forma de media ± error estándar de la media (n = 20-50 células por grupo). F: promedio de fluorescencia de proteína fluorescente verde intensificada-RyR2 observada en las células HEK-293 con expresión de RyR2^{WT} (n = 195) y RyR2^{R420Q} (n = 241). Δ: incremento; Cyt: citosol; eGFP: proteína fluorescente verde intensificada; F: fluorescencia; F₀: fluorescencia basal; H: homogeneizado; Mi: fracciones microsomales. ^ap < 0,05, RyR2^{R420Q} frente a RyR2^{WT}. ^bp < 0,001. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

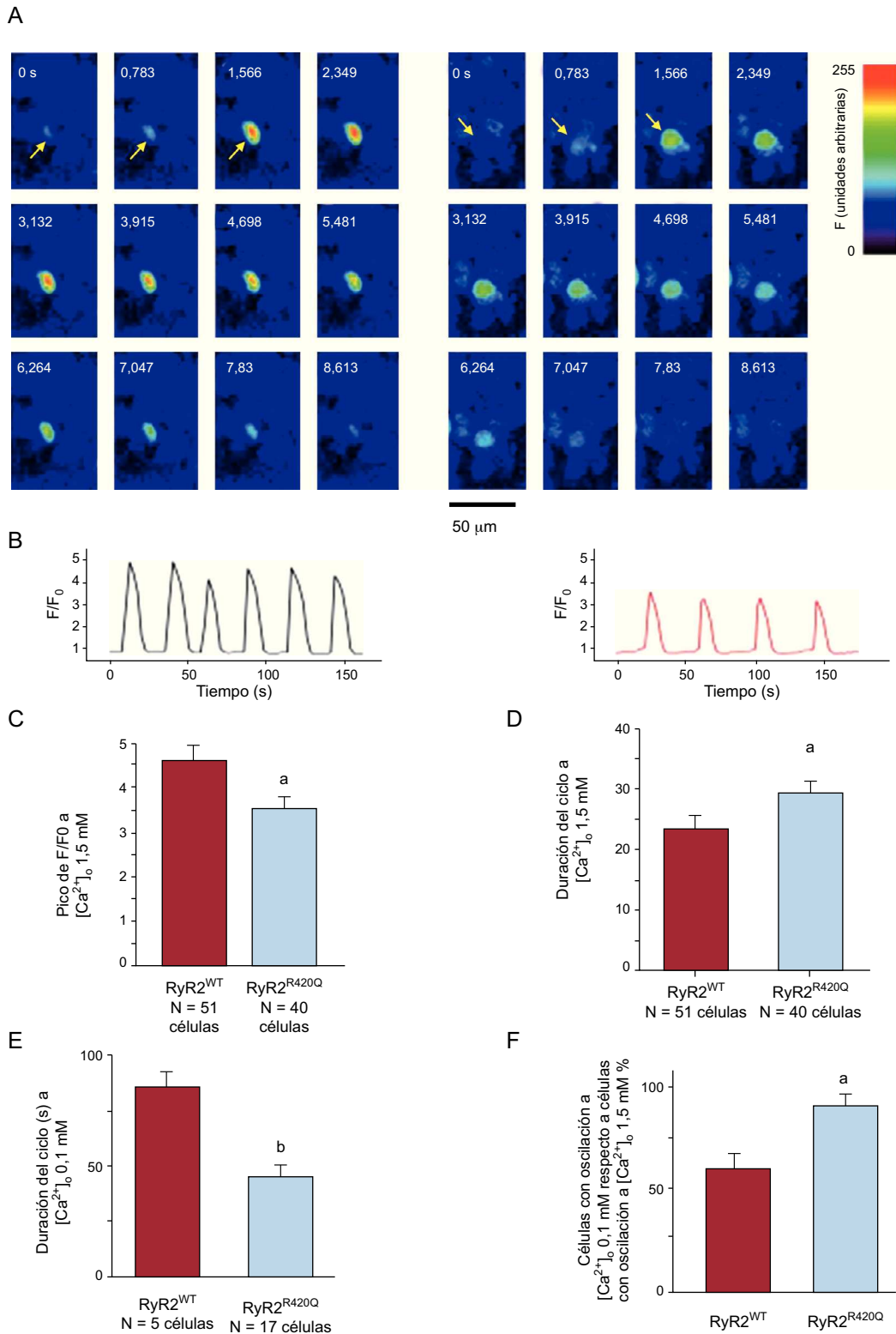


Figura 6. Las oscilaciones espontáneas del Ca^{2+} en las células HEK-293 que expresan $\text{RyR2}^{\text{R420Q}}$ son menores y más lentas, pero se convierten en más rápidas que las de RyR2^{WT} a un valor inferior de $[\text{Ca}^{2+}]_o$. A: serie temporal de imágenes confocales en células HEK-293 intactas con expresión de RyR2^{WT} (izquierda) y $\text{RyR2}^{\text{R420Q}}$ (derecha). B: perfiles de fluorescencia representativos en células HEK-293 intactas que expresan RyR2^{WT} (izquierda) y $\text{RyR2}^{\text{R420Q}}$ (derecha), a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 1,5 mM. C: amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 1,5 mM. D: igual que en C, pero para la duración del ciclo entre oscilaciones consecutivas del Ca^{2+} . E: igual que en D, pero a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 0,1 mM. F: porcentaje de células que oscilan a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 0,1 mM respecto a las células que oscilan a una $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 1,5 mM. $\text{RyR2}^{\text{R420Q}}$ frente a RyR2^{WT} . ^a $p < 0,05$. ^b $p < 0,01$. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.

DISCUSIÓN

Por primera vez se describe el fenotipo asociado a la mutación RyR2^{R420Q} en una familia muy sintomática, y destaca la elevada incidencia de arritmias no ventriculares. Los resultados *in vitro* confirman una disfunción del canal mutante.

El rendimiento general de la PE inicial para el diagnóstico de la TVPC (sensibilidad, 89%; valor predictivo positivo, 100%, y valor predictivo negativo, 93%) fue superior al descrito en otras series²⁶. El comportamiento de dos pacientes jóvenes con genotipo+ (IV:4 e IV:8) indica que la penetrancia podría estar relacionada con la edad. Además, hubo bradicardia sinusal, taquiarritmias auriculares y/o de la unión y ondas U gigantes tras ejercicio en los portadores de RyR2^{R420Q} (figuras 3 y 4). Se ha descrito ocasionalmente ondas U alternantes y cambios de polaridad de la onda U postextrasistólica en individuos con TVPC²⁷ (como consecuencia de una alteración de la homeostasis del Ca²⁺), y también un aumento del cociente U/T^{28,29} (que se considera la contrapartida electrocardiográfica de los pospotenciales tardíos). Es de destacar que los pacientes del estudio con TVPC presentaron un aumento de la amplitud de la onda U postextrasistólica y un aumento del cociente U/T con el ejercicio, precisamente con estímulo catecolaminérgico. El origen de las arritmias supraventriculares puede atribuirse a la mutación de RyR2, ya que RyR2 se expresa en todos los miocardiocitos, incluidas las células marcapasos y los miocitos auriculares^{30,31}. De hecho, recientemente se ha observado que la mutación RyR2^{R4496C} fomenta un aumento del automatismo en las células ventriculares¹⁵, pero con una disminución del automatismo en las células del nódulo sinoauricular⁹. Así pues, los canales RyR2 mutados parecen presentar una actividad disfuncionante que depende del tipo celular.

RyR2^{R420Q} forma parte del *cluster* aminoterminal e induce la sustitución del aminoácido básico de carga eléctrica alta (arginina) por un residuo aminoácido sin carga eléctrica (glutamina). Esta mutación, que se ha descrito recientemente en 4 pacientes no emparentados, por ahora carece de caracterización clínica y funcional^{14,32}. Es de destacar que el residuo aminoácido 420 está muy conservado en las distintas especies³² y se comporta como un punto caliente, dado que se han descrito diferentes sustituciones en el mismo punto y cerca de él (R420W^{3,33–35} e I419F^{36,37}). Conviene señalar que RyR2^{R420Q} muestra una penetrancia superior a la de RyR2^{R420W} (el 91 frente al 25%), y no manifiesta ninguna característica propia de una miocardiopatía arritmogénica^{33,34}.

Hasta ahora, la mayor parte de las mutaciones de la TVPC en las que se han realizado estudios funcionales se han comportado como mutaciones de ganancia de función^{35,38}. El aumento de la sensibilidad al Ca²⁺ (luminal o citosólico)^{15,24,38,39}, una alteración de la interacción entre los dominios aminoterminal y central^{40,41}, y la disminución de la unión de FKBP12.6^{38,39} constituyen los mecanismos más aceptados. Muy recientemente, se ha observado un efecto perturbador de la mutación RyR2^{R420Q} en la estructura cristalina de la región aminoterminal de RyR2, puesto que produce una supresión de la fijación del cloruro, que altera su pliegue de su dominio^{42,43} a pesar de que, en términos lineales, el residuo aminoácido 420 esté muy lejos de la región molecular para la que se propone la intervención en la activación dependiente del Ca²⁺ (residuos 4485–4494)⁴⁰. Se ha observado también que el extremo aminoterminal es una región estructural importante con capacidad de autotetramerizar, y puede intervenir en la regulación de la función del canal nativo⁴⁴. Así pues, parece claro desde un punto de vista estructural estático que RyR2^{R420Q} desestabiliza la interfaz entre subunidades, lo que probablemente facilite la apertura del canal^{42–45}.

Se presenta aquí la primera evaluación inicial de la mutación RyR2^{R420Q} desde una perspectiva funcional. En primer lugar, los

resultados de este estudio reflejan claramente que la mutación RyR2^{R420Q} se comporta como una mutación de ganancia de función tanto en las células permeabilizadas como en las intactas (figuras 5D, 6F, 6E y 6F) a una [Ca²⁺]_i muy baja, similar a la determinada en los miocardiocitos de rata y humanos^{46,47}. En segundo lugar, la razón de que se reduzca el pico de liberación de [Ca²⁺] causado por la cafeína en las células con RyR2^{R420Q} (figura 5E) no tiene una interpretación sencilla. Podría estar relacionada con un canal hipoactivo a valores de Ca²⁺ citosólico superiores, pero sin una desviación significativa de la EC₅₀. Por último, en las células RyR2^{R420Q} intactas, las oscilaciones espontáneas mostraron una disminución de la amplitud y la frecuencia (figuras 6B y 6D). Esta disminución podría explicar la bradicardia sinusal observada en los pacientes con TVPC (figura 3B), y no depende de una menor carga de Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico, ya que esta fue normal (véase «Resultados»).

Limitaciones del estudio

Los sistemas de expresión celular heterólogos son útiles para caracterizar las mutaciones de RyR2, aunque pueden tener limitaciones, ya que no permiten replicar el comportamiento eléctrico existente *in vivo*, en el que otras proteínas y el tono del sistema autónomo pueden interactuar con el canal disfuncional. Así pues, los experimentos realizados en ratones transgénicos o en iPS-CM (cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas) aportarán conclusiones más claras.

CONCLUSIONES

Este trabajo aporta una caracterización clínica novedosa y detallada de la mutación RyR2^{R420Q}. Los análisis resaltan que las arritmias no ventriculares son frecuentes y podrían reforzar la sospecha de TVPC en un contexto clínico apropiado. Además, los análisis *in vitro* indican que la RyR2^{R420Q} da lugar a un canal aberrante.

FINANCIACIÓN

Este trabajo contó con el apoyo de Instituto de Salud Carlos III (PI14/01477, RD12/0042/0029), Sociedad Española de Cardiología (Proyecto de Investigación Clínica en Cardiología Dr. Pedro Zarco), Biobanco La Fe (PT13/0010/0026), Prometeo 2011/027, ANR (Agence Nationale de la Recherche) (ANR-13-BSV1-0023), y Région Île-de-France (CORDIM, COD 100256). El INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) U-769 forma parte del Laboratory of excellence LERMIT (Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics), que cuenta con el apoyo de una subvención de ANR Investissements d'avenir. Patricia Neco contó con el respaldo de la Fondation pour la Recherche Médicale y Spyros Zissimopoulos, con el de la British Heart Foundation.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac arrest survivors with preserved ejection fraction registry (CASPER). *Circulation*. 2009;120:278–85.
- Palanca V, Quesada A, Trigo A, Jiménez J. Tormenta arritmica inducida por descargas del desfibrilador automático implantable en una taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59:1079–80.

3. Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff JM, Vaksman G, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet.* 2005;42:863–70.
4. Van der Werf C, Zwinderman AH, Wilde AM. Therapeutic approach for patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: state of the art and future developments. *Europace.* 2012;14:175–83.
5. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation.* 1995;91:1512–9.
6. Bhuiyan ZA, Van den Berg MP, Van Tintelen JP, Bink-Boelkens MT, Wiesfeld AC, Alders M, et al. Expanding spectrum of human RYR2-related disease: new electrocardiographic, structural, and genetic features. *Circulation.* 2007;116:1569–76.
7. Fisher JD, Krikler D, Hallidie-Smith KA. Familial polymorphic ventricular arrhythmias: a quarter century of successful medical treatment based on serial exercise-pharmacologic testing. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:2015–22.
8. Sumitomo N, Sakurada H, Taniguchi K, Matsumura M, Abe O, Miyashita M, et al. Association of atrial arrhythmia and sinus node dysfunction in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ J.* 2007;71:1606–9.
9. Neco P, Torrente A, Mesirca P, Zorio E, Liu N, Priori SG, et al. Paradoxical effect of increased diastolic Ca²⁺ release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2012;126:392–401.
10. Monteforte N, Napolitano C, Priori SG. Genética y arritmias: aplicaciones diagnósticas y pronósticas. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65:278–86.
11. Ackerman MJ, Marcou CA, Tester DJ. Medicina personalizada: diagnóstico genético de cardiopatías/canalopatías hereditarias. *Rev Esp Cardiol.* 2013;66:298–307.
12. The gene connection for the heart [citado 25 Abr 2014]. Disponible en: www.fsm.it/cardmoc/
13. Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvain A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I, et al. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 2012;21:2759–67.
14. Kawamura M, Ohno S, Naiki N, Nagaoka I, Dochi K, Wang Q, et al. Genetic background of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in Japan. *Circ J.* 2013;77:1705–13.
15. Fernández-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, et al. Increased Ca²⁺ sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2^{R4496C} underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res.* 2009;104:201–9.
16. Yano M. Ryanodine receptor as a new therapeutic target of heart failure and lethal arrhythmia. *Circ J.* 2008;72:509–14.
17. Thomas NL, George CH, Lai FA. Role of ryanodine receptor mutations in cardiac pathology: more questions than answers? *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 5):913–8.
18. Fernández-Velasco M, Gómez AM, Benitah JP, Neco P. Ryanodine receptor channelopathies: the new kid in the arrhythmia neighborhood. En: Yamada T, editor. *Tachycardia. Rijeka: InTech; 2012* [citado 25 Abr 2014]. Disponible en: www.intechopen.com/books/tachycardia/ryanodine-receptor-channelopathies-the-new-kid-in-the-arrhythmia-neighborhood
19. Ackerman MJ, Khositseth A, Tester DJ, Hejlik JB, Shen WK, Porter CB. Epinephrine-induced QT interval prolongation: a gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2002;77:413–21.
20. Thomas NL, George CH, Lai FA. Functional heterogeneity of ryanodine receptor mutations associated with sudden cardiac death. *Cardiovasc Res.* 2004;64:52–60.
21. Zissimopoulos S, Seifan S, Maxwell C, Williams AJ, Lai FA. Disparities in the association of the ryanodine receptor with the FK506-binding proteins in mammalian heart. *J Cell Sci.* 2012;125:1759–69.
22. Thomas NL, Lai FA, George CH. Differential Ca²⁺ sensitivity of RyR2 mutations reveals distinct mechanisms of channel dysfunction in sudden cardiac death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:231–8.
23. Maxchelator [citado 25 Abr 2014]. Disponible en: <http://maxchelator.stanford.edu>
24. Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P, et al. Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res.* 2005;97:1173–81.
25. Jiang D, Chen W, Wang R, Zhang L, Chen SR. Loss of luminal Ca²⁺ activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:18309–14.
26. López-Pérez M, Jiménez-Jáimez J, Gil Jiménez T, Macías-Ruiz R, Alvarez-López M, Tercedor-Sánchez L. Taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica: una entidad de diagnóstico difícil. *Rev Esp Cardiol.* 2014;67:229–31.
27. Aizawa Y, Komura S, Okada S, Chinushi M, Aizawa Y, Morita H, et al. Distinct U wave changes in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). *Int Heart J.* 2006;47:381–9.
28. Viitasalo M, Oikarinen L, Väänänen H, Kontula K, Toivonen L, Swan H. U-waves and T-wave peak to T-wave end intervals in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, effects of beta-blockers. *Heart Rhythm.* 2008;5:1382–8.
29. Paavola J, Viitasalo M, Laitinen-Forsblom PJ, Pasternack M, Swan H, Tikkanen I, et al. Mutant ryanodine receptors in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia generate delayed afterdepolarizations due to increased propensity to Ca²⁺ waves. *Eur Heart J.* 2007;28:1135–42.
30. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol.* 2005;562:223–34.
31. Kang G, Giovannone SF, Liu N, Liu FY, Zhang J, Priori SG, et al. Purkinje cells from RyR2 mutant mice are highly arrhythmogenic but responsive to targeted therapy. *Circ Res.* 2010;107:512–9.
32. Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, Van Tintelen JP, et al. The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:2065–74.
33. Baucé B, Rampazzo A, Basso C, Bagattin A, Daliento L, Tiso N, et al. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: early diagnosis of asymptomatic carriers. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:341–9.
34. Nishio H, Iwata M, Suzuki K. Postmortem molecular screening for cardiac ryanodine receptor type 2 mutations in sudden unexplained death: R420W mutated case with characteristics of status thymico-lymphatics. *Circ J.* 2006;70:1402–6.
35. Tester DJ, Spoon DB, Valdivia HH, Makielski JC, Ackerman MJ. Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases. *Mayo Clin Proc.* 2004;79:1380–4.
36. Tester DJ, Kopplin LJ, Will ML, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2:1099–105.
37. Choi K, Kopplin LJ, Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation.* 2004;110:2119–24.
38. Meli AC, Refaat MM, Dura M, Reiken S, Wronska A, Wojciak J, et al. A novel ryanodine receptor mutation linked to sudden death increases sensitivity to cytosolic calcium. *Circ Res.* 2011;109:281–90.
39. Wehrens XH, Lehmann SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 2003;113:829–40.
40. Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci.* 2002;7:d671–83.
41. Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, et al. Catecholaminergic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res.* 2010;106:1413–24.
42. Kimlicka L, Tung CC, Carlsson AC, Lobo PA, Yuchi Z, Van Petegem F. The cardiac ryanodine receptor N-terminal region contains an anion binding site that is targeted by disease mutations. *Structure.* 2013;21:1440–9.
43. Borko L, Bauerová-Hlinková V, Hostinová E, Gasperík J, Beck K, Lai FA, et al. Structural insights into the human RyR2 N-terminal region involved in cardiac arrhythmias. *Acta Cryst.* 2014;D70:2897–912. <http://dx.doi.org/10.1107/S1399004714020343>.
44. Seo MD, Velamakanni S, Ishiyama N, Stathopoulos PB, Rossi AM, Khan SA, et al. Structural and functional conservation of key domains in InsP3 and ryanodine receptors. *Nature.* 2012;483:108–12.
45. Györke I, Györke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites. *Biophys J.* 1998;75:2801–10.
46. Qing DP, Ding H, Vadgama J, Kopple JD. Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:84–92.
47. Hrabcová A, Pásek M, Šimurda J, Christé G. Effect of ion concentration changes in the limited extracellular spaces on sarcolemmal ion transport and Ca turnover in a model of human ventricular cardiomyocyte. *Int J Mol Sci.* 2013;14:24271–92.