



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Genetic basis of cardiac ion channel diseases

Koopmann, T.

Publication date
2008

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Koopmann, T. (2008). *Genetic basis of cardiac ion channel diseases*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.



Summary

Summary

Sudden death is mostly caused by structural cardiac disorders that ultimately result in lethal ventricular arrhythmias and is responsible for 50% of mortality from cardiovascular disease. In individuals >40 years of age, coronary artery disease is by far the most prevalent cause. In individuals \leq 40 years, various other causes are predominant. An estimated 60% to 75% of these young victims die of potentially inherited diseases, but many sudden death cases remain unexplained in clinical practice. Because sudden unexplained deaths in patients with or without structural cardiac abnormalities (secondary or primary cardiac arrhythmias respectively) may have heritable causes, cardiological and genetic assessment of surviving relatives of victims may reveal the underlying disease and unmask presymptomatic carriers. Especially the pathogenesis of primary cardiac arrhythmias, such as long QT syndrome and Brugada syndrome, remains unclear. Most mutations associated with these disorders are found in genes coding for ion channels: pore forming structures on the cell membrane responsible for transport of ions (such as sodium, potassium and calcium), that together bring about the cardiac action potential. The activity of these channels is regulated by voltage (voltage-gated ion channels) or agonist binding. Mutations in ion channel genes can lead to channel dysfunctioning, resulting in action potential changes (and cardiac arrhythmias). The aim of this thesis is to study the genetic basis of cardiac arrhythmias, which is essential for unraveling the pathogenesis of these arrhythmias. Such knowledge in turn provides new opportunities for patient management such as early (presymptomatic) identification and timely treatment of individuals at risk for developing fatal arrhythmias.

The first two chapters from this thesis are general introductions to the structures and function of several ion channels, as well as their involvement in cardiac arrhythmias. Chapter 1 is a general introduction to the genetics of primary cardiac arrhythmias. Chapter 2 concerns the biophysics and genetics of voltage-gated sodium channels in the heart and other organ systems. Sodium channels are responsible for the upstroke of the action potential and thereby play an important role in impulse propagation.

In chapter 3 a mutation in *SCN5A*, encoding the α -subunit of the cardiac sodium channel, is discussed. Mutations in *SCN5A* result in multiple arrhythmia syndromes, like (progressive) cardiac conduction disease, Brugada syndrome and sick sinus syndrome. Loss of sodium channel function reduces the upstroke of the action potential and may slow down action potential propagation, which leads to conduction defects. Mutations can also result in Brugada syndrome (BrS), an autosomal dominant disorder characterized by sudden cardiac death from ventricular tachyarrhythmias, in combination with a typical ECG pattern of ST segment elevation in leads V1–V3. This elevation is thought to be caused by abolishment of the action potential "dome" in epicardial but not endocardial cells, leading to increased heterogeneity of repolarization and ultimately rapid reentry resulting in ventricular fibrillation. An alternative explanation for the inscription of the ST-segment on the ECG and initiation of arrhythmias which is based on conduction delay in the right ventricular outflow tract (which could be caused by fibrosis), has also been proposed. Sick sinus syndrome (SSS) is an abnormality involving the generation of the action potential by the sinus node and is characterized by an inappropriate

atrial rate (too slow) for physiological requirements. The E161K mutation studied in this chapter was found in patients from two Dutch families and is associated with an overlap of syndromes: BrS, conduction disease and SSS. Electrophysiological and *in silico* measurements showed a decrease in sodium current, leading to conduction defects in atria and ventricles as well as a reduction in sinus rate by slowing of the diastolic depolarization rate and upstroke velocity of the sinus node action potential.

The involvement of a second gene could be an important modifier of sodium channel function, which might explain the difference in phenotype between patients in these families.

In chapters 4 and 5 the gene-regulating promoter region of *SCN5A* is studied. In chapter 4 we describe a haplotype variant in the *SCN5A* promoter, consisting of 6 polymorphisms in near-complete linkage disequilibrium. The haplotype has a significant impact on sodium channel expression *in vitro*, accounting for a large proportion of variance in ECG conduction parameters (prolonged PR and QRS durations) in normal subjects and BrS patients. Because the haplotype is common in Asians and absent in Caucasians, and has a large negative impact on cardiac conduction (a long-recognized feature of BrS) it may logically contribute to differences in BrS incidence as a function of ethnicity.

These data demonstrate that genetically-determined variable sodium channel transcription occurs in the human heart, and is associated with variable conduction velocity, an important contributor to arrhythmia susceptibility.

To further evaluate the functional effect of DNA variants in the *SCN5A* promoter, this region was screened for DNA variants in BrS patients and control subjects of diverse ethnicities. In chapter 5 several Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were identified. *In vitro* functional analysis in neonatal mouse cardiomyocytes identified 4 variants with significantly reduced reporter activity up to 55%. The data further reinforce the concept that sodium channel function varies on a transcriptional level even among apparently normal subjects.

In chapter 6 we investigated *SCN1B*, encoding the $\beta 1$ subunit, a key component of the sodium channel complex, in 282 probands with BrS and 44 with conduction disease. We identified three mutations segregating with arrhythmia in three kindreds, two of which were located in a newly-described alternately-processed transcript, $\beta 1B$. Both the canonical and alternately-processed transcripts are expressed to a greater degree in Purkinje cells consistent with the clinical presentation of conduction disease. Coexpression of the mutant $\beta 1$ and $\beta 1B$ -subunits with $Na_v1.5$ demonstrated reduced $Na_v1.5$ sodium current as a result of loss or altered β -subunit modulation of $Na_v1.5$. These findings implicate for the first time *SCN1B* as a disease gene for human arrhythmia susceptibility.

Screening for mutations in *SCN5A* uncovers a mutation in approximately 20% of BrS cases. In chapter 7 we investigated whether genetic heterogeneity and/or undetected *SCN5A* mutations, such as exon duplications and deletions, could be involved in the remaining 80% mutation-negative patients. *SCN5A* mutation-negative Dutch BrS probands were studied. The *SCN5A* gene was investigated for exon duplications and deletions and 11 candidate genes (such as sodium channel regulating β -subunits, Caveolin-3) were tested for the occurrence of point mutations and small insertions/deletions. Mutations in the recently with BrS associated gene *GPD1L* were

not found, implying that BrS-causing mutations in this gene are rare. Furthermore, large genomic rearrangements in *SCN5A* are not a common cause of BrS. Similarly, the studied candidate genes are unlikely to be major causal genes of BrS. Further studies are required to identify other genes responsible for this syndrome.

The Long QT syndrome (LQTS) is a cardiac arrhythmia characterized by a prolonged (heart rate corrected) QT interval on the ECG. LQTS is associated with syncope and sudden death caused by polymorphic ventricular tachycardia also known as *torsades de pointes*. The LQTS phenotype is caused by mutations in 12 different genes, such as the potassium channel encoding gene *KCNH2*. Studies carried out in large cohorts have shown that in 30% of cases no mutation is identified in the LQTS-associated genes. However, the PCR-based exon-scanning methodologies employed routinely to date in mutation analysis are unable to detect large genomic alterations such as large deletions and duplications. In chapter 8 the first large gene rearrangement consisting of a tandem duplication of 3.7 kb in *KCNH2* is described, responsible for LQTS in a Dutch family, by using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) analysis. MLPA is a quantitative multiplex approach to determine the relative copy number of gene exons. These findings carry implications for genetic testing in LQTS patients. Analysis for large gene alterations as the one described herein in routine genetic testing may provide a genetic diagnosis in a number of patients in whom conventional mutation screening fails to uncover a mutation.

In conclusion, in the last decades, much research has been done to unravel the pathogenesis of primary cardiac arrhythmias. This research remains very important, since our increasing knowledge may lead to better targeted treatment of patients suffering from these (life threatening) disorders.

Samenvatting

Plotse dood wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door structurele hartafwijkingen, die uiteindelijk leiden tot letale hartritmestoornissen (kamerfibrilleren). In patiënten >40 jaar is coronair lijden de meest voorkomende oorzaak van plotse hartdood, in tegenstelling tot patiënten jonger dan 40 jaar, waar andere oorzaken verantwoordelijk zijn voor het plotselinge overlijden. Erfelijke aandoeningen zijn in ongeveer 60 tot 75% van deze jonge slachtoffers de oorzaak, maar in veel gevallen wordt geen verklaring gevonden. Hoewel erfelijke levensbedreigende (familiaire) hartritmestoornissen verantwoordelijk kunnen zijn voor het optreden van plotse hartdood in de af- en aanwezigheid van structurele hart afwijkingen (respectievelijk primaire en secundaire aritmie syndromen), zijn de onderliggende mechanismen van voornamelijk de primaire aritmie syndromen, zoals het lange QT syndroom en het Brugada syndroom, nog niet opgehelderd. De meeste mutaties die geassocieerd zijn met deze hartziekten zijn gevonden in genen die coderen voor ionkanalen. Ionkanalen zijn structuren in de celmembranen die verantwoordelijk zijn voor iontransport en zijn selectief doorgankelijk voor bepaalde ionen (zoals natrium, kalium en calcium). De activiteit van de kanalen wordt gereguleerd door onder andere de membraanspanning of door binding van een agonist aan een nabijgelegen receptor (respectievelijk spannings- of receptorgestuurde kanalen). De ionkanalen zorgen samen voor de totstandkoming van de cardiale actiepotentiaal. Wanneer een van deze ionkanalen, door een mutatie bijvoorbeeld, niet normaal functioneert, kan dat leiden tot verschillende primaire hartritmestoornissen.

Het doel van dit proefschrift is het onderzoeken van de genetische basis van primaire hartritmestoornissen om meer inzicht te krijgen in het ontstaan en de behandeling van deze (levensbedreigende) ziekten.

De eerste twee hoofdstukken van dit proefschrift zijn algemene inleidingen over de structuren en functies van verschillende ionkanalen, evenals de rol van deze ionkanalen in het ontstaan van hartritmestoornissen. Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding in de genetica van primaire hartritmestoornissen. Hoofdstuk 2 gaat over de biofysica en genetica van spanningsgestuurde natriumkanalen die tot expressie komen in het hart en in andere delen van het lichaam. Natriumkanalen zijn verantwoordelijk voor het genereren van actiepotentialen en spelen een belangrijke rol in het doorgeven van de elektrische impuls.

In hoofdstuk 3 wordt een mutatie beschreven in *SCN5A*, het gen dat codeert voor de α -subunit van het natriumkanal in het hart. Mutaties in *SCN5A* geven aanleiding tot minder goed functioneren van dit kanaal, wat kan leiden tot bijvoorbeeld geleidingsstoornissen, het Brugada syndroom en sinusknop disfunctie. Geleidingsstoornissen door een verminderde natriumstroom worden veroorzaakt door een minder snelle fase 0 van de actiepotentiaal, waardoor de depolariserende stroom naar omliggende hartspiercellen minder snel loopt en dus de geleiding van de cardiale actiepotentiaal wordt vertraagd. Mutaties in *SCN5A* zijn ook geassocieerd met het Brugada syndroom (BrS). BrS is een ziekte met karakteristieke ECG-afwijkingen in combinatie met een verhoogd risico op plotselinge hartdood. De ECG-afwijkingen betreffen rechts precordiale ST-segment-elevatie en (discrete) geleidingsstoornissen in alle hartcompartimenten. De rechts precordiale ST-elevatie wordt verklaard door het ontstaan van inhom-

geniteit in actiepotentiaal vorm en duur tussen epicardiale en endocardiale actiepotentialen of een toenemende lokale geleidingsvertraging in de uitstroombaan van de rechter kamer, eventueel veroorzaakt door fibrose.

Hoewel de rol van *SCN5A* in de sinusknop niet duidelijk is, zijn mutaties in dit gen ook geassocieerd met sinusknop disfunctie. Aangeboren sinusknop disfunctie, zonder verworven hartafwijkingen zoals ischemie, cardiomyopathie of hartfalen, wordt gekarakteriseerd door sinusbradycardie en sinusknop arrest.

De E161K mutatie beschreven in dit hoofdstuk is gevonden in patiënten uit twee Nederlandse families en is geassocieerd met een overlap van syndromen: BrS, geleidingsstoornissen en sinusknop disfunctie. Electrofysiologische en *in silico* onderzoeken wezen uit dat de E161K mutatie leidt tot geleidingsstoornissen in atria en kamers, en verminderde diastolische depolarisatie en upstroke van de sinusknop actiepotentiaal, als gevolg van verminderde natriumstroom. Een verklaring voor de verschillende fenotypes geassocieerd met dezelfde mutatie zou kunnen zijn dat er meerdere mutaties of veelvoorkomende variaties (polymorfismen) in *SCN5A* en andere genen aan het fenotype bijdragen.

In hoofdstuk 4 en 5 is de gen-regulerende promotor van *SCN5A* onderzocht. In hoofdstuk 4 wordt een haplotype in de promotor beschreven, bestaande uit 6 variaties in bijna compleet linkage disequilibrium, wat betekent dat ze samen overerven. Het haplotype heeft een significante invloed op de expressie van het natriumkanal *in vitro* en is verantwoordelijk voor variatie in ECG geleidingsparameters (verlenging van de PQ- en QRS-interval duur) in gezonde patiënten en Aziatische BrS patiënten. Genetisch bepaalde variabele genexpressie van het natriumkanal zoals beschreven in dit hoofdstuk is geassocieerd met variabele geleiding, wat kan bijdragen aan het optreden van hartritmestoornissen.

In hoofdstuk 5 is gezocht naar variaties in de *SCN5A* promotor in BrS patiënten en controle individuen met verschillende ethnische achtergronden, die mogelijk invloed hebben op de expressie van dit gen. Verschillende polymorfismen zijn geassocieerd met een verminderde *SCN5A* expressie (tot 55% in muis cardiomyocyten) in een *in vitro* systeem. Deze polymorfismen kunnen verantwoordelijk zijn voor variatie in transcriptie van het natriumkanal en kunnen daarom een rol spelen bij de verschillen in penetrantie en expressie van primaire aritmie syndromen.

In hoofdstuk 6 hebben we *SCN1B*, coderend voor de β -subunit, een belangrijk onderdeel van het natriumkanal complex, onderzocht in 282 BrS patiënten en 44 patiënten met geleidingsstoornissen. We hebben 3 mutaties gevonden, die co-segregeren met ritmestoornissen in 3 families. Twee van de beschreven mutaties zijn gevonden in een *SCN1B* coderend isovorm, $\beta 1B$. Beide isovormen komen het meest tot expressie in de Purkinje cellen, wat consistent is met geleidingsstoornissen. Co-expressies van de mutante $\beta 1$ en $\beta 1B$ -subunits met $Na_v1.5$ demonstreerden een verminderde $Na_v1.5$ natriumstroom door een verminderde of andere modulatie van β -subunit met $Na_v1.5$. Dit onderzoek associeert voor de eerste keer *SCN1B* met het ontstaan van hartritmestoornissen.

In slecht 20% van de patiënten met BrS wordt een mutatie gevonden. In hoofdstuk 7 worden meerdere kandidaatgenen onderzocht op mutaties en wordt gezocht naar exon duplicaties, deleties of inserties in *SCN5A*, die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de resterende 80%

van de mutatie-negatieve BrS patiënten. Nederlandse BrS patiënten zonder mutatie in *SCN5A* werden onderzocht. De 11 kandidaatgenen bestonden onder andere uit genen die een regulerende rol spelen in het functioneren van *SCN5A* (β -subunits, Caveolin-3) en het recent met BrS geassocieerde gen *GPD1L*, die ook een *SCN5A*-regulerende rol speelt. Er zijn geen mutaties in *GPD1L* gevonden, wat waarschijnlijk betekent dat mutaties in dit gen geen grote spelen bij BrS in Nederland. Ook zijn geen mutaties in de kandidaatgenen of grote deleties/inserties in *SCN5A* gevonden in deze patiënten. Dit suggereert dat andere (nog niet bekende) genen een rol kunnen spelen bij het ontstaan van BrS.

Het lange QT-interval syndroom (LQTS) is een ziekte die zich uit door verlenging van het QT-interval op het ECG, waardoor gemakkelijk ritmestoornissen kunnen ontstaan die kunnen leiden tot wegrakingen en/of terugkerende syncopes en plotseling overlijden. Tot nu toe zijn twaalf genen geassocieerd met LQTS, waaronder het kaliumkanaal coderende gen *KCNH2*. In ongeveer 70% van de LQTS patiënten is een mutatie aangetoond in een van deze genen. In hoofdstuk 8 wordt voor het eerst een 3.7 kb duplicatie in *KCNH2* in een familie met LQTS beschreven. Zulke grote duplicaties of inserties/deleties van meerdere exonen kunnen met de huidige niet-kwantitatieve exon-screening methoden niet aangetoond worden. In dit geval is gebruik gemaakt van Multiplex-Ligation dependent Probe Amplification (MLPA), een nieuwe kwantitatieve techniek om het aantal kopieën van een exon vast te stellen. Diagnostische mutatiedetectie in LQTS patiënten moet in de toekomst wellicht uitgebreid worden met MLPA analyse, om mutaties te vinden in de resterende 30% van mutatie-negatieve LQTS patiënten.

Concluderend, hoewel de laatste jaren veel vooruitgang is geboekt wat betreft het begrijpen van de genetische mechanismen die kunnen leiden tot primaire hartritmestoornissen, blijft onderzoek erg belangrijk om alle genetische mechanismen te ontrafelen. Hopelijk kunnen in de toekomst patiënten preventief opgespoord en behandeld worden, waardoor het risico om plotseling te overlijden verminderd wordt.