

HVORDAN TOLKE MUTASJONSSVAR VED LANG QT-TID-SYNDROM OG ANDRE GENETISKE HJERTESYKDOMMER

*Kristina H. Haugaa og Ida Skrinde Leren, Kardiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet*

Bruken og tilgjengeligheten av genetisk testing ved hjertesykdom har økt betraktelig det siste tiåret, og per i dag er dette noe de fleste kardiologer blir involvert i. Genetisk testing for hjertesykdom i Norge utføres ved Enhet for hjertegenetikk, Oslo universitetssykehus (OUS). Indikasjoner for genetisk testing har blitt omtalt i Hjerteforum tidligere (ref. K. E. Berge og T. Leren, Hjerteforum nr 4, 2014), og i denne artikkelen vil vi ta for oss hvordan man klinisk tolker det svaret man får fra genetisk laboratorium samt viktige momenter i oppfølgingen av pasienter med genetisk hjertesykdom. Vi har her fokusert på tolking av mutasjonssvar ved lang QT-tid-syndrom (LQTS), men de samme prinsippene gjelder for alle genetiske hjertesykdommer.

LQTS ble første gang beskrevet av de to norske legene Anton Jervell og Fred Lange-Nielsen i 1957 (1). De beskrev en familie på Sørlandet der 4 av 6 barn var døde og hadde lang QT-tid i EKG. 3 av de 4 døde barna døde før 8 års alder. Noen år senere beskrev Romano (2) og Ward (3) lignende sykdomsbilder, men uten døvheter. I 1991 fant man den genetiske bakgrunnen for sykdommen, og det viste seg at de uten døvheter var heterozygote mutasjonsbærere (arvet mutasjon fra en av foreldrene), og de med døvheter var homozygote mutasjonsbærere (arvet mutasjoner fra begge foreldrene). LQTS i sin vanligste form, uten døvheter, har en prevalens på 1:2000, men er langt hyppigere i enkelte fylker i Norge (4,5).

I dag kjenner man til 12 gener der mutasjoner gir LQTS og 35 ulike gener der mutasjoner er assosiert med forlenget QT-tid. Imidlertid er det fortsatt slik at de tre genene man oppdaget først, er de der man

hyppigst påviser mutasjoner, mens de resterende forekommer bare i enkelt-familier.

Gentesting

Indikasjoner for gentesting med tanke på LQTS er (6):

1. Sterk klinisk mistanke om LQTS, basert på klinikk eller familiehistorie i tillegg til forlenget QT-intervall på EKG
2. Asymptomatiske individer med klart forlenget QT-tid (> 480 ms) uten annen årsak
3. Førstegradsslekninger i familier der det er påvist en sikker sykdomsgivende mutasjon

Rutinemessig testes det for de 5 vanligste genene: KCNQ1, HERG, SCN5A, MINK og MIRP1.

I starten av den genetiske eraen var forhåpningene høye om at man kunne få et fasitsvar på hvorvidt en pasient var syk eller ikke. Imidlertid kan det ofte være vanskelig å si sikkert om en påvist mutasjon er sykdomsgivende, eller om den kun er en normalvariant, og svaret på en genetisk test er gjenstand for tolkning i lys av det totale kliniske bildet på samme måte som andre supplerende undersøkelser. Teknologien for genetisk analyse har også utviklet seg betydelig. Mange steder har man tatt i bruk «whole exome»- (og også «whole genome»-) testing der man undersøker hele pasientens genetiske materiale. Med økende bruk og omfang av genetisk diagnostikk blir det derfor en stadig større utfordring å tolke mutasjonssvar og vurdere om den påviste genvarianten er sykdomsgivende eller kun er en normalvariant.

Hvordan tolke svar på genetiske tester

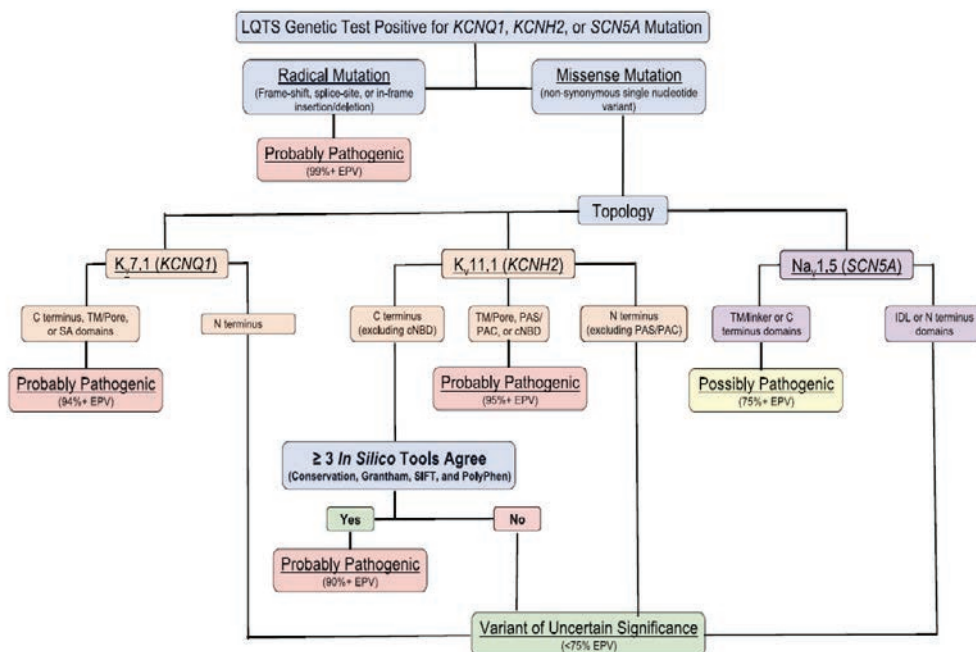
Her skisserer vi to mulige prøvesvar fra genetisk laboratorium:

1. Pasient XX er heterozygot bærer av mutasjon G306R i KCNQ1-genet. Mutasjonen er påvist i en rekke norske pasienter med LQTS-fenotype og er en sikker årsak til LQTS. Mutasjonen er ikke funnet i databasen over 5000 friske individer. Mutasjonen innebærer en endret aminosyre, og prediksjonsprogrammene PolyPhen2 og SIFT indikerer begge «protein damage».
2. Pasient YY er heterozygot bærer av mutasjon R397W i KCNQ1-genet. Mutasjonen er ikke tidligere påvist hos norske pasienter, men er funnet hos 5 av 5000 friske individer. Aminosyreendringen innebærer at aminosyre arginin i posisjon 397 er erstattet med aminosyren tryptofan i posisjon 397. Prediksjonsprogrammet PolyPhen2 indikerer «probably damaging» og SIFT indikerer «affect protein function».

I scenario 1 er tolkningen enkel; vi har en sikkert patogen mutasjon der vi kan være trygge på at dette er mutasjonen som fører til pasientens forlengede QT-tid og eventuelle symptomer. Vi kan gå videre med genetisk screening av familiemedlemmene og følge opp de mutasjonspositive med kardiologisk utredning og oppfølging. De mutasjonsnegative familiemedlemmene kan slippe videre kontroller, betrakte seg som friske og har ingen risiko for å videreføre sykdommen til egne barn.

I scenario 2 hersker det mer usikkerhet omkring mutasjonsfunnet, ettersom 5 av ca. 5000 antatt friske personer er heterozygote for mutasjonen. Vi vet derfor ikke om mutasjonen har betydning for den aktuelle sykdomshistorien. Før man går videre med testing av familiemedlemmer må man gjøre seg opp en mening om hvorvidt man tror at mutasjonen har noe med symptomene å gjøre. Vi skal her redegjøre for denne beslutningsprosessen.

For å avgjøre mutasjonens patogenitet må følgende momenter tas med i betraktningen (se også figur 1).



Figur 1: Flytskjema for tolkning av mutasjonssvar som inkluderer både mutasjonstype og lokalisering av mutasjonen. Gjengitt med tillatelse fra Giudicessi JR og Ackerman MJ, Curr Probl Cardiology 2013(9)

Major-indikasjoner for patogenisitet

Fenotype hos pasienten

Pasientens fenotype er viktig når man vurderer å rekvirere gentest. Jo mer sannsynlig det er klinisk at pasienten har LQTS, jo større er sjansen for at man får et korrekt genetisk svar. Like viktig er det motsatte; uklarer fenotype og lav pretest-sannsynlighet for at det foreligger LQTS gir større risiko for falske positive svar. Sjeldne normalvarianter i de 3 vanligste LQTS-genene finnes hos 4 % av den hvite befolkningen og hos 6-8 % av den svarte befolkningen (7). Dette skaper genetisk «støy» og vanskeliggjør tolkningen av gensvar. Sammenlignet med andre genetiske hjertesykdommer er «støyforekomsten» ved LQTS relativt lav. Ved arytmiogen høyre ventrikkelkardiomyopati (ARVC) foreligger genvarianter hos så mange som 16 % av befolkningen (8), og risikoen for falskt positive gensvar er derfor høyere.

Er mutasjonene tidligere beskrevet i litteraturen?

Hvis en mutasjon tidligere er beskrevet hos pasienter og familier med typisk fenotype, er man tryggere på at mutasjonen er patogen. Spesielt dersom tidligere publikasjoner kan påvise ko-segregasjon i familien (se under).

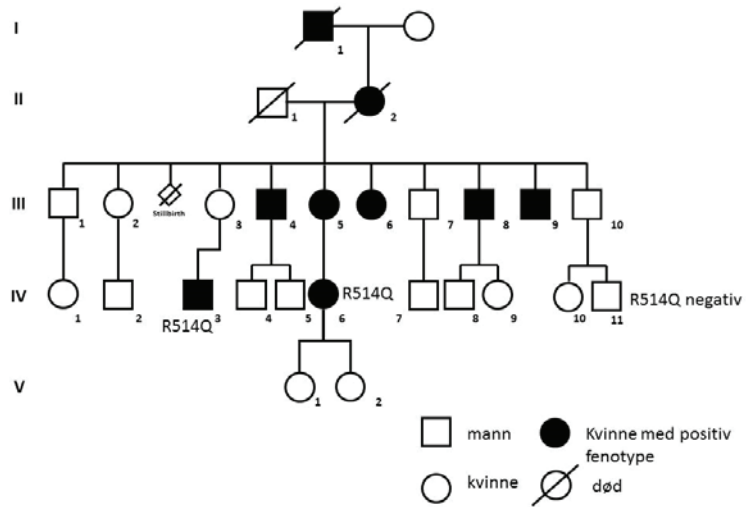
Er det ko-segregering av fenotype og genotype i familien?

Ko-segregasjon betyr at symptomene følger mutasjonen i en familie. Det vil si at mutasjonspositive familiemedlemmer har positiv fenotype (forlenget QTc), mens mutasjonsnegative ikke har forlenget QTc. Ko-

segregasjonsanalyser er viktige for å avgjøre patogenisiteten, men vanskeliggjøres ofte av redusert penetrans, som betyr at ikke alle med mutasjon har forlenget QT-tid selv om mutasjonen er patogen. Figur 2 viser et familietre der mutasjonspositive medlemmer også har symptomer på forlenget QT-tid. I tillegg er enkelte asymptomatiske familiemedlemmer gentestet, og disse har ikke mutasjonen. Altså det foreligger ko-segregasjon av genotype og fenotype.

Er mutasjonen tidligere påvist ved det aktuelle laboratoriet og hva slags fenotype hadde den/de mutasjonen ble påvist hos?

Mutasjoner er ofte geografisk spesifikke for den populasjon som bor der. Norge har genetisk sett en homogen befolkning, og det genetiske laboratoriet som utfører testene opparbeider seg derfor lokalkunnskap om aktuelle mutasjoner. Mutasjoner som er hyppige i Norge, og som er påvist hos flere pasienter med sammenfallende fenotype, trenger derfor ikke nødvendigvis være påvist i andre land. I Norge har genetisk diagnostikk for LQTS vært utført ved Enhet for hjer-tegenetikk, OUS, i 11 år, og man har derfor opparbeidet seg betydelig erfaring kunn-



Figur 2: Familietre med ko-segregasjon av symptomer og mutasjonsfunn. Figuren viser en familie med autosomt dominant arvemønster. To familiemedlemmer (individ 3 og 6 i IV generasjon) med symptomer er genpositive for varianten R514Q. Dette styrker mistanken om at R514Q er sykdomsgivende. Videre hjelper det vurderingen at individ 11 i samme generasjon ikke har symptomer, er gentestet og ikke har mutasjonen. Altså er det ko-segregasjon av geno- og fenotype.

skap om de norske mutasjonene, noe som hjelper ved vurderingen av patogenisitet.

Er mutasjonen funnet i databasene over friske kontrollpersoner og i så fall hvor hyppig?

I år 2000 ble det menneskelige genomet kartlagt for første gang. Det foreligger nå databaser på ca. 5000 exoner og ca. 1000 genomer fra antatt friske personer. Disse personene er ikke nødvendigvis undersøkt for aktuelle fenotype, og man kan derfor ikke utelukke at det foreligger uoppdaget sykdom. Disse databasene er tilgjengelige, og om den mutasjonen man har fått påvist hos sin pasient ikke forekommer blant de friske, øker sannsynligheten for at mutasjonen er patogen. Riktignok kan det ikke utelukkes at påviste variant forekommer hyppigere i populasjonen som pasienten tilhører, sammenlignet med populasjonen/populasjonene som personene inkludert i de store databasene er rekruttert fra. Ofte ser man at mutasjonen er funnet hos for eksempel 5 av 5000 friske, og da blir forandringen å betrakte som en sjelden variant. Patogenisitet kan ikke utelukkes, men er mindre sannsynlig.

Hvor i proteinet er mutasjonen lokalisert, og hvilken skade medfører mutasjonen?

Avhengig av mutasjonens karakter får den varierende konsekvens i proteinsyntesen. Mutasjoner som forårsaker et prematurt stoppkodon vil resultere i et avbrutt protein, om i det hele tatt et protein. Disse mutasjonene betraktes i større grad å være sikkert patogene sammenliknet med missense-mutasjoner som kun gir opphav i én aminosyreendring, mens aminosyresammensetningen for øvrig er uendret. Videre kan en aminosyreforandring slå ulikt ut om den forekommer i utkanten (tilsvarer N-terminal eller C-terminal) av proteinet, enn hvis den for eksempel affiserer ionekanalens pore. Mutasjoner som forårsaker poreforandringer, har større sannsynlighet for å føre til redusert ionekanalfunksjon, og det er derfor mer sannsynlig at de er patogene.

Minor-indikasjoner for patogenisitet

Elektrofysiologisk fenotype i in vitro-studier (patch clamp-teknikk)

Det var knyttet store forhåpninger til patch clamp-teknikk med tanke på muligheten for å teste proteinfunksjon og kanalfunksjon i LQTS-relaterte ionekanaler in vitro. Metoden går i korthet ut på at man fremstiller ionekanaler med den aktuelle aminosyreforandringen og tester de elektriske egenskapene in vitro. Hvis kanalfunksjonen med mutasjonen er svekket in vitro, kan man anta at dette også er tilfelle in vivo. Teknikken har store begrensninger i det man har sett at ionekanaler in vivo og in vitro kan oppføre seg svært forskjellig. Metoden er også ressurskrevende og utføres ikke rutinemessig klinisk i Norge.

Sammenfallende resultater fra in silico-fenotype-prediksjonsprogrammer

1. PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping)
2. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)

Prediksjonsprogrammene PolyPhen2 og SIFT er det to mest brukte for å vurdere en missens-mutasjonspatogenisitet. Disse programmene tar for seg lokalisasjonen og ladningsforandringene i proteinet som mutasjonen medfører. I tillegg legger programmene til grunn om en aminosyre er konservert mellom ulike arter. Endringer av konserverte aminosyrer tolereres i mindre grad enn endringer av aminosyrer som ikke er konserverte. Ut fra disse forandringene simulerer programmet om mutasjonen vil få konsekvenser for proteinets funksjon. Metoden bør brukes med varsomhet, men ved sammenfallende svar fra flere ulike prediksjonsprogrammer øker sannsynligheten for korrekt vurdering.

Som vist i denne oversikten er tolkningen av et mutasjonssvar ikke alltid enkel, og man må ofte ta avgjørelsen om patogenisitet basert på indisier. Det er ikke alltid man finner et sikkert svar, og både pasienten og legen havner i en utilfredsstillende situasjon. Ved mutasjoner med usikker betydning må man ikke gå videre med familieundersøkelser med mindre andre familiemedlemmer også har symp-

toer. Hvis andre familiemedlemmer har symptomer, er det hensiktsmessig med kosegregasjonsanalyser, men disse må foregå under streng kontroll og tett veiledning av familien. Påvisning av usikre mutasjoner hos friske familiemedlemmer skaper stor uro, engstelse og frustrasjon hos både vedkommende, familien og doktoren.

Det er anbefalt tett samarbeid mellom kardiolog og genetiker for å vurdere grunnlaget for familieundersøkelser ved usikre mutasjoner. Ved OUS har vi regelmessige møter med kardiologer, pediater og gentikere der vi sammen anslår sannsynligheten for at en mutasjon er patogen og hvorvidt det er hensiktsmessig å gå videre med familieundersøkelser.

Referanser

1. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957;54:59-68.
2. Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. II. syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation (Presentation of 1st case in italian pediatric literature)]. *Clin Pediatr (Bologna)* 1963;45:656-83.
3. Ward OC. A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* 1964;54:103-6.
4. Berge K, Leren T. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Norway. *Clin Genet* 2013.
5. Leren T, Berge K. Epidemiologi ved genetisk betinget hyperkolesterolemi, kardiomyopati og lang QT-tid-syndrom. *Hjerteforum* 2013;26:33-39.
6. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm* 2011;8:1308-39.
7. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009;120:1752-60.
8. Kapplinger JD, Landstrom AP, Salisbury BA et al. Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2317-27.
9. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Genotype- and phenotype-guided management of congenital long QT syndrome. *Curr Probl Cardiol* 2013;38:417-55.