

Genetic variations involved in congenital and acquired long QT syndrome : identification and functional characterization

Citation for published version (APA):

Paulussen, A. D. C. (2003). *Genetic variations involved in congenital and acquired long QT syndrome : identification and functional characterization*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2003

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Chapter 1 discusses the most common characteristics of long QT syndrome (LQTS). This syndrome is responsible for the majority of unexplained sudden deaths without any recognisable heart disease. The “beating” of a heart is set in motion by a series of electrical impulses that make the heart muscle contract, pump the blood through the body, and supply it with oxygen. In LQTS patients, the balance between these electrical impulses can be suddenly disrupted, which may trigger an uncoordinated heart rhythm. The result is a shortage of oxygen which can lead to sudden loss of consciousness or, when sustained, to sudden death. The syndrome is named after the distance between two characteristic waveforms visible on an ECG, respectively the QRS-complex and the T-wave. In the majority of LQTS patients this distance is too long, resulting in a heartbeat recovery time that is too small to initiate the next one. The chapter describes how ionic currents through ion channels in the cell membrane of ventricular cells are responsible for the balance in the electrical impulses. LQTS is caused by mutations in genes encoding the ion channels and is genetically inherited. The genes that have been identified so far are potassium channel genes *KCNQ1*, *KCNH2* and modulating β -subunits *KCNE1* and *KCNE2*, and sodium channel gene *SCN5A*. The function of the genes is discussed, including the functional effects of mutations in these genes. The second part of the introduction deals with acquired LQTS, a form of LQTS caused by drug intake. All the different drug classes and some additional risk factors that can contribute to acquired LQTS are discussed.

Chapter 2 describes the detection and functional characterisation of a novel missense mutation in the *KCNH2* gene that was detected in a LQTS family. This mutation causes trafficking deficiency of the HERG protein to the cell membrane, where it should function as an ion channel. The trafficking deficiency could be restored by lower incubation temperatures or by incubation with chemical chaperones. Tetramerisation of wild type subunits with mutant subunits was not possible at 37°C, resulting in 50% non-functional channels (haplo-insufficiency) but no dominant negative effect.

Chapter 3 describes a LQTS patient with two different missense mutations in two different LQTS genes. The first detected mutation (A572D, *SCN5A*) could not explain the LQTS symptoms, as this mutation was inherited from the maternal side of the family, while LQTS characteristics were only observed at the paternal side. Further screening of other LQTS genes led to the detection of a missense mutation in another gene (V254 M, *KCNQ1*) that could explain the LQTS characteristics in family members from the paternal side. The observation that a LQTS patient can carry more than one mutation, each with a separate contribution to the phenotype, indicates the importance of a thorough screening of all LQTS genes.

Chapter 4 describes two large LQTS families, each with a different mutation that was identified in the *KCNH2* gene, respectively E698X and P872fs877. Both mutations lead

to premature stop codons resulting in truncated HERG proteins. Only the HERG P872fs877 truncated protein was expressed; the HERG E698X protein was hardly detectable. The P872fs877 HERG protein was functional although transport of the protein to the cell membrane was disrupted by partial retention of the proteins in the endoplasmic reticulum. The kinetics of homo-multimeric HERG P872fs877 were comparable to wild type homo-multimers. However, with formation of hetero-multimers, kinetic differences as compared to wild type kinetics were observed. In summary, the E698X mutation leads to 50% haplo-insufficiency and the P872fs877 mutation leads to partial haplo-insufficiency combined with a kinetically dominant negative effect on channel function.

Chapter 5 illustrates the connection between the congenital LQTS and acquired LQTS by genetic screening of a healthy volunteer participating in a clinical trial. The volunteer was screened for mutations in all LQTS genes because of an observed prolongation of the QT-interval in response to drug treatment. A mutation in the *KCNH2* gene (Y667X) was identified that was inherited from the maternal side. Both mother and son had a baseline prolongation of the QT-interval, although both were asymptomatic. This study shows that the percentage of congenital LQTS patients in the general population is underestimated, and that especially these asymptomatic, unidentified LQTS patients may be vulnerable to the development of arrhythmia by drug intake.

Chapter 6 describes the search for a genetic background in variable CYP3A5 expression. Both the CYP3A4 and CYP3A5 proteins are responsible for the metabolism of many endo- and exogenous compounds and show substantial overlapping substrate specificity. Many drugs that might induce acquired LQTS are metabolised by these enzymes. Human CYP3A5 expression in the liver is highly variable: CYP3A5 expression can be detected in only 10-30% of Caucasians. We identified two polymorphisms in the promoter region of the *CYP3A5P1* gene that were in linkage disequilibrium. The less frequent allele was associated with high expression levels of CYP3A5 mRNA and protein in the liver. The Caucasian population frequency of this allele was 18%, in line with the percentage in the population that shows high CYP3A5 expression. The observations of chapter 5 and 6 were investigated in a population of 32 acquired LQTS patients (Chapter 7). Only a minority of these patients (6%) was carrier of a mutation in one of the congenital LQTS genes. The patients in which arrhythmia were provoked by a CYP3A4/5 substrate were all carrier of the *CYP3A5P1* genotype predictive of low CYP3A5 expression. Although statistical significance needs to be explored in a larger acquired LQTS population, one factor that influences the risk for acquired LQTS might be an impaired ability of CYP3A5 metabolism.

In summary, all the observations from previous chapters are discussed in Chapter 8. The added value but also shortcomings of genetic screening in congenital and acquired LQTS are discussed as well as the novel insights into the functional consequences of identified mutations. The chapter is concluded with possible future steps in the better understanding of several features characteristic for both congenital and acquired LQTS syndrome.

Samenvatting

De voornaamste karakteristieken van het verlengde QT-interval syndroom (LQTS) worden besproken in Hoofdstuk 1. Deze aandoening is verantwoordelijk voor het grootste percentage aan plotseling overlijden zonder verdere aantoonbare hartproblemen. Het “kloppen” van het hart wordt veroorzaakt door een aaneenschakeling van specifieke elektrische impulsen die de hartspier doen samentrekken, het bloed rondpompt en hiermee het lichaam van zuurstof voorziet. Bij LQTS patiënten kan de coördinatie tussen deze elektrische impulsen verstoord raken, waardoor een ongecontroleerd hartritme ontstaat. Het gevolg is een tekort aan zuurstof dat kan leiden tot bewusteloosheid en eventueel ook tot overlijden. Een typisch kenmerk van deze aandoening is de verlengde afstand tussen het QRS-complex en de T-golf op een electrocardiogram. Door deze verlenging is bij de meeste LQTS patiënten de tijdsduur van hartslagen dusdanig lang dat de benodigde, tussenliggende herstelperiode in het gedrang komt. Hoofdstuk 1 beschrijft dat ionenkanalen in de celmembraan van ventriculaire hartcellen verantwoordelijk zijn voor de elektrische impulsbalansen. Congenitale LQTS is een erfelijke aandoening die wordt veroorzaakt door mutaties in genen die coderen voor deze ionenkanalen. De genen die tot nu toe zijn geïmpliceerd in congenitale LQTS, zijn de kaliumkanalen *KCNQ1*, *KCNH2* en hun bijbehorende, modulerende β -subeenheden *KCNE1* en *KCNE2*, en het natriumkanal *SCN5A*. De functie van deze genen wordt besproken, alsook de functionele effecten die mutaties in de genen tot gevolg kunnen hebben. Het tweede deel van de inleiding bespreekt de verworven vorm van LQTS. Er wordt een overzicht gegeven van de verschillende medicijnklassen die deze vorm kunnen veroorzaken en een aantal belangrijke additionele risicofactoren. Hoofdstuk 1 wordt afgesloten met een overzicht van de doelstellingen van dit proefschrift.

Hoofdstuk 2 beschrijft de detectie en functionele karakterisatie van een nieuwe mutatie in het *KCNH2* gen die werd gedetecteerd in een LQTS familie. Deze mutatie verhindert een normaal transport van het eiwit (HERG) naar de celmembraan, waar het zijn functie als ionenkanaal dient te vervullen. Dit transportprobleem kon gecorrigeerd worden door de omgevingstemperatuur te verlagen of door chemische stoffen aan het eiwit te binden. Omdat tetramerisatie van wild type met gemuteerde subeenheden niet mogelijk was op 37°C, is de helft van het totaal aantal kanalen niet functioneel (haploinsufficiëntie) en kan men niet spreken van een dominant negatief effect.

Hoofdstuk 3 beschrijft een LQTS patient waarin twee missense mutaties in twee verschillende LQTS genen werden gevonden. De eerst gevonden missense mutatie (A572D, *SCN5A*) kon geen verklaring geven voor de LQTS symptomen omdat die werd overgeërfd langs de maternale tak van de familie terwijl LQTS karakteristieken alleen in de paternale tak voorkwamen. Door verdere screening van andere LQTS genen werd een tweede missense mutatie gevonden in een ander gen (V254M, *KCNQ1*), die de

LQTS karakteristieken in de familieleden langs paternale kant wél kon verklaren. De observatie dat een LQTS patiënt meer dan één mutatie kan dragen, elk met een verschillende pathogene bijdrage tot het fenotype, geeft het belang van een goede strategie voor grondige screening van alle gekende LQTS genen aan.

Hoofdstuk 4 beschijft twee grote LQTS families waarin een causale mutatie werd gevonden in het *KCNH2* gen voor elke familie, respectievelijk E698X en P872fs877. Beide mutaties leiden tot een prematuur stopcodon waardoor een gedeelte van het C-terminale eindstuk van het eiwit ontbreekt. Enkel het P872fs877 gemuteerde HERG eiwit kwam tot expressie, terwijl het E698X HERG eiwit nauwelijks aantoonbaar was. Het P872fs877 HERG eiwit was functioneel, maar het transport naar de celmembraan bleek verstoord door een gedeeltelijke retentie in het endoplasmatisch reticulum. De kinetiek van P872fs877 mutante homo-multimeren was vergelijkbaar met wild type homo-multimeren, maar bij de vorming van hetero-multimere kanalen ontstaan kinetische verschillen ten opzichte van wild type kanalen. Mutatie E698X geeft dus aanleiding tot 50% haploinsufficiëntie; mutatie P872fs877 resulteert in haploinsufficiëntie gecombineerd met een kinetisch dominant negatief effect.

Hoofdstuk 5 illustreert de link tussen congenitale en verworven LQTS. Het genomische DNA van een gezonde vrijwilliger, die deelnam aan een klinische studie, werd gescreend voor mutaties in LQTS genen vanwege een verlenging van het QT interval die werd geobserveerd als respons op de toediening van medicatie. Een *KCNH2* nonsense mutatie (Y667X) werd gevonden, die was overgeërfd van zijn moeder. In beide familieleden bleek het QT interval verlengd, maar verder waren beiden asymptomatisch. Deze studie toont aan dat de frequentie van congenitaal LQTS in de normale bevolking mogelijk wordt onderschat en dat de asymptomatische LQTS patiënten meer gevoelig kunnen zijn voor het ontstaan van ritmestoornissen door medicatie.

In Hoofdstuk 6 werd gezocht naar een genetische achtergrond van variabele CYP3A5 expressie. De CYP3A4 en CYP3A5 eiwitten zijn betrokken in het metabolisme van vele endo- en exogene stoffen, en vertonen qua substraatspecificiteit veel overlap. Een groot deel van de medicijnen die verworven LQTS kunnen veroorzaken worden door deze enzymen afgebroken. De expressie van CYP3A5 is zeer variabel: in slechts 10-30% van de Caucasische populatie kan CYP3A5 expressie worden aangetoond in de lever. Door middel van mutatiescreening ontdekten we twee DNA polymorfismen in de promotor regio van het *CYP3A5P1* gen, die in linkage disequilibrium zijn. Het minst frequente allel van deze polymorfismen is geassocieerd met een hogere, hepatische expressie van CYP3A5 mRNA en eiwit. De Caucasische populatiefrequentie van dit allel bedroeg 18%, in lijn met het percentage van de populatie dat hogere CYP3A5 expressie vertoont.

In Hoofdstuk 7 werden de bevindingen van hoofdstuk 5 en 6 in een groep van 32 patiënten met verworven LQTS getest. Slechts een klein percentage (6%) van deze patiënten blijkt drager van een overgeërfd mutatie in een LQTS gen. De patiënten waarin LQTS was geïnduceerd door een CYP3A4/CYP3A5 substraat bezaten allen een

CYP3A5P1 genotype dat is geassocieerd met een lagere *CYP3A5* expressie. Deze observatie dient in de toekomst in een grotere patiëntengroep bekeken te worden om de statistische relevantie te kunnen berekenen.

Tenslotte worden de bevindingen van de voorgaande hoofdstukken bediscussieerd in Hoofdstuk 8. De toegevoegde waarde, maar ook de beperkingen, van mutatiescreening van LQTS genes in congenitaal en verworven LQTS patiënten wordt besproken, alsook de nieuwe inzichten in de functionele consequenties van de gevonden mutaties. Tenslotte worden mogelijkheden voorgesteld voor verder onderzoek in beide vormen van LQTS, die kunnen leiden tot een verbeterd inzicht in de aandoeningen en efficiëntere therapieën.