



Modificatori genetici del rischio aritmico nella morte cardiaca improvvisa: dalla sindrome del QT lungo alle patologie cardiache più comuni

Elisa Mastantuono¹, Cinzia Dossena¹, Roberto Insolia², Federica Dagradi¹,
Barbara Petracchi¹, Roberto Rordorf¹, Simone Savastano¹, Alessandro Vicentini¹,
Lia Crotti², Peter J Schwartz²

¹Clinica Cardiologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, e

²Dipartimento di Medicina Molecolare, Sezione di Cardiologia, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

Modificatori genetici del rischio aritmico nella morte cardiaca improvvisa: dalla sindrome del QT lungo alle patologie cardiache più comuni

Gli studi sulla patogenesi della morte cardiaca improvvisa si sono concentrati sul rapporto tra background genetico individuale e suscettibilità aritmica. Questa relazione, inizialmente descritta nelle patologie cardiache ereditarie come la sindrome del QT lungo (LQTS), è stata poi estesa alla ricerca di fattori genetici modulanti il rischio aritmico (genetic modifiers) nella popolazione generale. La sindrome del QT lungo è una patologia aritmogena, che predispone a tachicardie ventricolari maligne e morte cardiaca improvvisa, il cui substrato patogenetico è costituito da mutazioni nei geni codificanti i canali ionici implicati nel potenziale d'azione cardiaco. Tuttavia, il quadro clinico dei pazienti LQTS spesso mostra una spiccata variabilità fenotipica, anche in portatori della stessa mutazione, suggerendo la presenza di altri fattori genetici modificanti il rischio aritmico. In questo senso, gli studi sulla sindrome del QT lungo possono rappresentare una risorsa fondamentale per l'identificazione di genetic modifiers in patologie cardiache più comuni: infatti, è stato dimostrato come un polimorfismo nella popolazione caucasica (K897T), localizzato in gene codificante un canale ionico cardiaco, possa modulare il rischio aritmico sia nella sindrome del QT lungo che nella fase subacuta dell'infarto. Allo stesso modo l'individuazione di un particolare substrato genetico in grado di modificare la lunghezza dell'intervallo QT nella popolazione generale può fornire utili indicazioni per la ricerca di nuovi target genetici nella sindrome del QT Lungo: l'esempio paradigmatico è rappresentato da alcune varianti genetiche comuni di NOS1AP. Tutti questi risultati suggeriscono la strada per future applicazioni cliniche dei genetic modifiers nella stratificazione del rischio aritmico individuale.

Genetic modifiers of arrhythmogenic risk in sudden cardiac death: from long QT syndrome to common cardiac disorders

Research on pathogenesis of sudden cardiac death have focused on the relationship between individual genetic background and arrhythmogenic susceptibility. This relationship was initially highlighted in cardiac hereditary disease, such as long QT syndrome (LQTS), and then spread to genetic factors modulating the arrhythmic risk (genetic modifiers) in the general population. Long QT syndrome (LQTS) is an inherited arrhythmogenic disease predisposing to malignant ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. Mutations in genes encoding ion channels involved in the cardiac action potential are the pathogenic substrate in LQTS. However, clinical presen-

tation in long QT syndrome patients carrying the same disease-causing mutation may evidence a wide phenotypic spectrum, suggesting the presence of other genetic factors influencing the arrhythmogenic risk. Therefore, investigating genetic bases of LQTS we may identify genetic modifiers in more common cardiac disorders: as a matter of fact, the K897T Caucasian polymorphism in a gene encoding cardiac ionic channel was demonstrated to modulate the arrhythmogenic risk both in LQTS and in the subacute phase of myocardial infarction. Similarly, the characterization of a specific genetic substrate modifying QT interval duration in the general population may provide useful clues in the search of genetic modifiers of the long QT syndrome: common genetic variants in NOS1AP gene are the paradigmatic example. Overall these results may represent the first step for future clinical use of genetic modifiers in the stratification of individual arrhythmogenic risk.

Trattazione

L'impatto della morte cardiaca improvvisa (Sudden Cardiac Death, SCD) nei Paesi Occidentali è devastante, rappresentando quasi il 20% della mortalità totale e il 50% di quella dovuta a cause cardiovascolari [1]; si tratta di un evento legato a differenti patologie cardiache che possono prevedere o meno un danno d'organo sottostante. L'obiettivo fondamentale nell'approccio alla SCD è la prevenzione dell'evento primario che causa l'arresto cardiaco. Nel caso di patologie cardiache più comuni, quali per esempio la patologia coronarica, i fattori di rischio che possono supportare il clinico nella prevenzione della morte cardiaca improvvisa sono più facilmente individuabili. Tuttavia una buona parte dei casi di SCD avvengono nella popolazione apparentemente sana, ed il meccanismo più frequente ad essi legato è quello di tipo aritmico. L'identificazione dei soggetti ad alto rischio aritmico rappresenta quindi la base per definire nuove strategie preventive nella SCD. Alla fine degli anni '90 alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato come una storia familiare positiva per SCD costituisca un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza di morte cardiaca improvvisa nella popolazione generale [2-4]. In particolare, i risultati dello studio prospettico PARIS [4], condotto arruolando in oltre 15 anni più di 7,000 pazienti tra i 40 e 50 anni di età, hanno evidenziato un aumento del rischio di SCD del doppio in presenza di un genitore con SCD, e di quasi 10 volte nel caso che entrambi i genitori fossero morti improvvisamente. Allo stesso modo arruolando pazienti con infarto miocardico acuto (IMA), è emerso come anche in tale sottogruppo la storia familiare rappresenti un fattore di rischio importante [5-6].

Alla luce di queste evidenze gli studi sulla patogenesi della morte cardiaca improvvisa si sono concentrati sul rapporto tra background genetico individuale e suscettibilità aritmica, allo scopo di identificare specifici marker genetici in grado di migliorare la stratificazione del rischio aritmico individuale. Inizialmente gli studi si sono limitati a patologie cardiache ereditarie su base genetica come la sindrome del QT lungo (LQTS) o la cardiomiopatia ipertrofica, dimostrando l'importanza dei test genetici per l'ottimale gestione clinica dei pazienti. La sindrome del QT lungo rappresenta, in questo senso, un efficace modello di studio per indirizzare la ricerca in merito alle basi genetiche delle patologie cardiache più comuni: la lunghezza dell'intervallo QT, espressione della fase di ripolarizzazione ventricolare, rappresenta infatti un marcatore di rischio aritmico, valido in differenti contesti clinici.

La sindrome del QT lungo è una patologia aritmogena ereditaria caratterizzata da aumentato rischio di tachiaritmie ventricolari maligne, fra cui in particolare la torsione di punta (TdP); questo quadro, soprattutto in soggetti giovani apparentemente sani, può sfociare nella morte improvvisa [7]. Il substrato patogenetico della malattia è rappresentato da mutazioni a livello dei canali ionici implicati nel potenziale d'azione cardiaco [7]. Le moderne tecniche di biologia molecolare hanno permesso di identificare 13 varianti di LQTS, ognuna delle quali riconducibile a un differente substrato genetico; fra queste, le forme LQT1, LQT2 e LQT3 interessano approssimativamente il 90% dei pazienti portatori di una

mutazione LQTS. La prima variante legata ad alterazioni nel gene *KCNQ1*, che codifica la subunità alfa di un canale al potassio (IKs), rappresenta circa il 50% delle forme di LQTS. Gli eventi cardiaci nei pazienti LQT1 solitamente si associano ad attività fisica intensa, tanto che il nuoto è un noto trigger aritmico; l'attività fisica induce infatti la stimolazione della componente simpatica cardiaca, a fronte di un mancato adeguamento dell'intervallo di ripolarizzazione, a causa del deficit funzionale dei canali al potassio mutati. Gli eventi cardiaci nei pazienti LQT2, portatori di mutazioni nel gene *KCNH2* codificante la subunità maggiore del canale al potassio IKr, sono principalmente associati a forti emozioni. Un meccanismo opposto, che vede una maggiore attività dei canali ionici al sodio (I-Na), è invece dovuto a mutazioni in *SCN5A* (LQT3), ascrivibili a meno del 10% dei pazienti LQTS, nei quali la bradicardia solitamente associata al sonno rappresenta il maggiore trigger aritmico [7-8].

Tuttavia, le suddette correlazioni genotipo-fenotipo si manifestano spesso in quadri patologici più complessi che suggeriscono la presenza di altri fattori, implicati nella genesi aritmica della malattia e in grado di modulare l'effetto funzionale della disease-causing mutation. Infatti in soggetti portatori della stessa mutazione LQTS, la probabilità di eventi cardiaci può essere estremamente variabile: il ventaglio clinico può spaziare dai quadri più severi alla completa asintomaticità. L'aspetto più peculiare in tal senso è rappresentato dal fenomeno della penetranza incompleta, ovvero la mancanza di segni clinici di malattia e di allungamento dell'intervallo QT, in soggetti portatori della mutazione genetica. Queste considerazioni hanno quindi suggerito la ricerca di modificatori genetici in grado di modulare il rischio di morte cardiaca improvvisa nella sindrome del QT lungo: potenziali candidati risultano essere i polimorfismi a carico di un singolo nucleotide (SNPs), localizzati negli stessi geni LQTS oppure in altri loci genetici non ancora individuati. Il nostro gruppo ha quindi dimostrato come il polimorfismo comune K897T nel gene *KCNH2*, la cui prevalenza nella popolazione caucasica è del 33% [9], possa interagire con la mutazione A1116V localizzata nello stesso gene, accentuando la riduzione della corrente IKr; ne consegue un allungamento dell'intervallo QT ed un aumento del rischio aritmico [10]. Lo studio è iniziato dopo il ricovero presso il Policlinico San Matteo di Pavia di una donna di 44 anni, con anamnesi positiva per sincopi, a seguito di arresto cardiaco conseguente a fibrillazione ventricolare. Dall'analisi Holter ECG delle 24 ore è emersa la presenza di onde T difasiche in V3-V5 e valori di QT oltre i 530 msec; l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza sia del polimorfismo K897T che della variante novel A1116V nel gene *KCNH2*. Estendendo l'analisi molecolare ai familiari è poi emerso come i portatori della variante A116V fossero tutti omozigoti wild-type per il polimorfismo K897T e non mostrassero segni clinici di malattia. Lo studio elettrofisiologico in vitro ha quindi dimostrato che solo la co-presenza della A1116V con il polimorfismo K897T si associava a un chiaro e severo fenotipo LQTS [10]. Un gruppo indipendente ha poi confermato il ruolo di modifier genetico esercitato dal polimorfismo K897T, anche nella fase pre e post natale [11]. Questo polimorfismo, associato ad una mutazione nello stesso gene, è stato infatti identificato sia in un caso di morte intrauterina tardiva che in un caso di SIDS; in entrambi i casi era presente una coppia di genitori caucasici: la madre, asintomatica ma con transitori riscontri di QT prolungato, era portatrice della mutazione mentre il padre, completamente asintomatico, era portatore del polimorfismo K897T [11].

A seguito dell'alta prevalenza del polimorfismo K897T nella popolazione generale, si è deciso di investigare il ruolo di questa variante non solo nella sindrome del QT lungo, ma anche in patologie cardiache più comuni, quali l'infarto miocardico acuto (IMA) [12]. È noto infatti come nella fase post-infarto possano comparire delle aritmie maligne, talvolta associate a prolungamento dell'intervallo QT; circa il 2% dei pazienti post-IMA può addirittura sviluppare delle torsioni di punta, le cui cause non sono state fin'ora caratterizzate [13]. Abbiamo quindi dimostrato come il polimorfismo K897T aumenti il rischio (circa 8 volte) di sviluppare TdP nei giorni seguenti un IMA; questo background genetico predisponente all'instabilità ritmica, viene probabilmente slatentizzato dal rimodellamento elettrico, tipico del tessuto post infartuale [12]. Questi studi condotti sul polimorfismo K897T hanno

confermato come la ricerca di marker genetici nell'ambito della sindrome del QT lungo costituisca un prezioso punto di partenza per indagare il rapporto tra background genetico e suscettibilità aritmica nella popolazione generale. Parallelamente l'individuazione di un particolare substrato genetico in grado di modificare la lunghezza dell'intervallo QT nella popolazione generale può fornire utili indicazioni per la ricerca di nuovi target genetici nella sindrome del QT lungo: l'esempio paradigmatico è rappresentato dalle varianti genetiche comuni del gene NOS1AP. Per attuare queste ricerche nella popolazione generale sono stati effettuati studi di genome-wide association (GWAS), basati sulla ricerca nell'intero genoma di varianti genetiche comuni modulanti il rischio aritmico; sono state quindi identificate delle varianti comuni che si associano significativamente alla frequenza cardiaca [14,15] e a indici elettrocardiografici di conduzione, quali l'intervallo QT [16-19], PR [15, 20,21] e QRS [15,22]. In particolare, è stata dimostrata l'associazione di alcune varianti genetiche comuni di NOS1AP sia con la durata dell'intervallo QT che con la morte cardiaca improvvisa [16-19]. Il gene NOS1AP codifica per una ossido nitrico sintasi (CAPON), coinvolta nella modulazione del canale al calcio durante il potenziale d'azione cardiaco, e può quindi essere implicata nell'instabilità del ritmo cardiaco. Partendo da queste evidenze, il nostro gruppo ha condotto uno studio di target genotyping nella popolazione LQT1 Sud Africana, riuscendo a dimostrare come il gene NOS1AP sia un modificatore genetico nella sindrome del QT lungo [23]. La popolazione sudafricana, segregante la mutazione A341V nel gene KCNQ1, è definita founder in quanto tutti soggetti discendono da un unico progenitore; tuttavia, sebbene portatori dello stesso difetto genetico, i soggetti presentano dei quadri di malattia molto variabili [24]. Proprio nelle popolazioni founder si evidenzia quindi la variabilità fenotipica legata a fattori genetici secondari, laddove invece la presenza della stessa mutazione dovrebbe conferire il medesimo fenotipo clinico a tutti i soggetti mutati. Da diversi anni il nostro gruppo indaga i soggetti appartenenti a questa popolazione LQT1 sudafricana, essendo stato possibile ricostruirne l'albero genealogico completo, risalendo alla coppia progenitrice del XVII secolo [25]. L'analisi genetica è stata condotta su 255 individui (143 mutation carriers e 112 non-mutation carriers), e la valutazione di una eventuale associazione fra il marker genetico ed il fenotipo in esame è stata condotta utilizzando un approccio statistico (pedigree disequilibrium test, PDT), specifico per campioni correlati quali quelli di una founder population [23]. È emerso quindi come gli alleli minori di due SNPs di NOS1AP (rs4657139, $P=0.019$; rs16847548, $P=0.003$) mostrassero una differente trasmissione quando valutati in associazione con la presenza di eventi cardiaci di qualsiasi gravità (sincope, arresto cardiaco, morte improvvisa). Gli stessi marcatori genetici sono anche risultati significativamente associati (rs4657139, $P=0.028$; rs16847548, $P=0.014$) agli eventi cardiaci più severi, quali arresto cardiaco e/o morte improvvisa. In merito alla modulazione dell'intervallo QT, sono stati considerati i mutation-carriers con $QT_c < 472$ ms e quelli con $QT_c > 492$ ms, in assenza di terapia β -bloccante, al fine di condurre un'analisi stringente su una casistica pulita. È quindi emerso come gli alleli minori di rs4657139 e di rs16847548 fossero significativamente associati ad un intervallo $QT_c > 492$ ms (rs4657139, $P=0.03$; rs16847548 $P=0.03$) [23]. A conferma di questi dati, il ruolo potenzialmente aritmogeno esercitato da varianti comuni di NOS1AP è stato successivamente dimostrato anche in pazienti LQTS non correlati [26]. I dati in merito a NOS1AP così come il ruolo del polimorfismo K897T nel gene KCNH2 concorrono a creare uno scenario in cui specifiche varianti genetiche, più o meno comuni e localizzate in loci genomici differenti, rappresentano il substrato sul quale si possono inserire eventuali mutazioni: la possibile interazione fra varianti disease-causing e varianti comuni andrà quindi a definire l'effettivo rischio aritmico individuale. Questi risultati inoltre dimostrano come l'approfondimento degli aspetti molecolari e cellulari alla base della modulazione dell'intervallo QT possa aiutare a quantificare il rischio di morte cardiaca improvvisa. In tal modo si apre la strada per potenziali sviluppi clinico-diagnostici di test su campioni ematici, in grado di identificare specifici marcatori genetici per la stratificazione del rischio aritmico.

Bibliografia

1. Kolder ICRM, Tanck WTM, Bezzina CR. Common genetic variant modulating cardiac ECG parameters and susceptibility to sudden cardiac death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012;52:620-629.
2. Friedlander Y, Siscovick DS, Weinmann S et al. Family history as a risk factor for primary cardiac arrest. *Circulation* 1998;97:155-160.
3. Friedlander Y, Siscovick DS, Arbogast P et al. Sudden death and myocardial infarction in first degree relatives as predictors of primary cardiac arrest. *Atherosclerosis* 2002;162:211-216.
4. Jouven X, Desnos M, Guerot C et al. Predicting sudden death in the population: the Paris Prospective Study I. *Circulation* 1999;99:1978-1983.
5. Dekker LR, Bezzina CR, Henriques JP et al. Familial sudden death is an important risk factor for primary ventricular fibrillation: a case-control study in acute myocardial infarction patients. *Circulation* 2006;114:1140-1145.
6. Kaikkonen KS, Kortelainen ML, Linna E et al. Family history and the risk of sudden cardiac death as a manifestation of an acute coronary event. *Circulation* 2006;114:1462-1467.
7. Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R. Long QT syndrome: from genetics to management. *Circulation Arrhythm Electrophysiol* 2012;in press.
8. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmia. *Circulation* 2001;103:89-95.
9. Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS et al. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc* 2003;78:1479-1487.
10. Crotti L, Lundquist AL, Insolia R et al. KCNH2-K897T is a Genetic Modifier of Latent Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* 2005;112:1251-1258.
11. Nof E, Cordeiro JM, Pérez GJ et al. A Common Single Nucleotide Polymorphism Can Exacerbate Long QT Type 2 Syndrome Leading to Sudden Infant Death. *Circulation* 2010;3(2):199-206.
12. Crotti L, Hu D, Barajas-Martinez H et al. Torsade de Pointes following Acute Myocardial Infarction: Evidence for a Deadly Link with a Common Genetic Variant. *Heart Rhythm* 2012;in press.
13. Halkin A, Roth A, Lurie I et al. Pause-dependent torsade de pointes following acute myocardial infarction: a variant of the acquired long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1168-1174.
14. Marroni F, Pfeufer A, Aulchenko YS et al. A genome-wide association scan of RR and QT interval duration in 3 European genetically isolated populations: the EUROSPAN project. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:322-328.
15. Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO et al. Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet* 2010;42:117-122.
16. Arking DE, Pfeufer A, Post W et al. A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nature Genet* 2006;38:644-651.
17. Pfeufer A, Sanna S, Arking DE Muller M et al. Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study. *Nature Genet* 2009;41:407-414.
18. Eijgelsheim M, Aarnoudse AL, Rivadeneira F et al. Identification of a common variant at the NOS1AP locus strongly associated to QT-interval duration. *Hum Mol Genet* 2009;18:347-357.
19. Kao WH, Arking DE, Post W et al. Genetic variations in nitric oxide synthase 1 adaptor protein are associated with sudden cardiac death in US white community-based populations. *Circulation* 2009;119:940-951.
20. Chambers JC, Zhao J, Terracciano CM et al. Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat Genet* 2010;42:149-152.
21. Pfeufer A, Van NC, Marcianti KD et al. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet* 2010;42:153-159.
22. Sotoodehnia N, Isaacs A, de Bakker PI et al. Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat Genet* 2010;42:1068-1076.
23. Crotti L, Monti MC, Insolia R et al. NOS1AP is a genetic modifiers of the Long QT syndrome. *Circulation* 2009;120:1657-1663.
24. Brink PA, Crotti L, Corfield V et al. Phenotypic variability and unusual clinical severity of congenital long-QT syndrome in a founder population. *Circulation* 2005;112(17):2602-2610.
25. Brink PA, Schwartz PJ. Of founder populations, long QT syndrome, and destiny. *Heart Rhythm* 2009;11:25-33.
26. Tomás M, Napolitano C, De Giuli L et al. Polymorphisms in the NOS1AP gene modulate QT interval duration and risk of arrhythmias in the long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2010;15;55:2745-2752.