

## PRACA POGLĄDOWA

## Molekularne metody stosowane w diagnostyce zespołu long-QT

### Molecular methods used in diagnosis of long-QT syndrome

Ewa Moric-Janiszewska, Marta Głowacka, Ludmiła Węglarz

## STRESZCZENIE

LQTS (*long-QT syndrome*) oznacza wrodzony zespół wydłużonego odcinka QT i jest chorobą kanałów jonowych uwarunkowaną genetycznie. U jej podstaw leżą mutacje genów kodujących białka i podjednostki kanałów jonowych błony podstawnej kardiomiocytów, istotne dla prawidłowego ich funkcjonowania. Jej głównymi cechami są: wydłużenie odstępu QT (> 450 ms) widoczne w obrazie EKG, pojawianie się omdleń, zatrzymania akcji serca oraz nagła śmierć sercowa SCD (*sudden cardiac death*), spowodowana występowaniem wielokształtnego częstoskurczu komorowego typu *torsade de pointes* (TdP) lub też migotaniem komór. Obecnie zidentyfikowano 12 odmian zespołu long-QT, które spowodowane są aż 600 mutacjami genów zlokalizowanych w chromosomach: 3, 4, 6, 7, 11, 17, 21. Zależnie od mutacji konkretnego genu, w zespole LQT wyodrębniono podtypy od LQTS1 do LQTS12. Poznanie zaburzeń genetycznych w poszczególnych typach LQTS umożliwiło wprowadzenie terapii zależnej od genotypu.

Ze względu na częste niewystępowanie objawów klinicznych aż u 40% nosicieli zmutowanych genów bardzo ważna jest szybka i skuteczna diagnostyka. U pacjentów takich nie zawsze sprawdzają się kliniczne kryteria diagnostyczne i dlatego należy ich diagnozować metodami molekularnymi. W przedstawionej pracy opisano niektóre (SSCP, sekwencjonowanie, ilościowy PCR) najczęściej stosowane, molekularne metody diagnostyki zespołu long-QT.

## SŁOWA KLUCZOWE

zespół long-QT, kanały jonowe, analiza molekularna

## ABSTRACT

LQTS (*long QT syndrome*) is a genetic disorder caused by the mutations of genes adversely affecting the ion channel function in the cellular membranes of cardiac myocytes. Prolonged repolarization detected on a ECG as a longer QT interval (> 450 ms) is responsible for syncope, cardiac

Katedra i Zakład Biochemii  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
w Sosnowcu  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach

## ADRES

## DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Ewa Moric-Janiszewska  
Katedra i Zakład Biochemii  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
w Sosnowcu  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Narcyzów 1  
41-200 Sosnowiec  
tel. +48 32 364 10 06  
e-mail: ejaniszewska@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 4, 41-47  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

arrest and sudden cardiac death (SCD), due to transient “torsade de pointes” (TdP) or ventricular fibrillation. Currently, 12 types of long-QT syndrome have been identified, which are caused by 600 mutations of genes located on chromosomes: 3,4,6,7,11,17,21. Depending on the particular gene mutation in the LQT syndrome, subtypes from LQTS1 to LQTS12 were identified. The knowledge of genetic disorders in different types of LQTS has enabled the introduction of genotype-dependent therapy. Due to the frequent absence of clinical signs in 40% of mutant genes carriers, it is very important to develop fast and effective diagnostics. These patients do not always suit the clinical diagnostic criteria and therefore they should be diagnosed using molecular methods. In the present study we describe some molecular methods (SSCP, sequencing, quantitative PCR) most commonly used in genetic diagnostics of the long-QT syndrome.

#### KEY WORDS

long-QT syndrome, ion channels, molecular analysis

#### WSTĘP

Wrodzony zespół wydłużonego odcinka QT (*long QT syndrome* – LQTS) należy do rzadkich chorób uwarunkowanych genetycznie. Jej istotę stanowią zaburzenia funkcji lub budowy kanałów jonowych zlokalizowanych w sercu, skutkujące nieprawidłową repolaryzacją kardiomiocytów i pojawieniem się wskutek tego ryzyka arytmii serca i nagłej śmierci sercowej. Cechami charakterystycznymi u pacjentów z LQTS są: wydłużony odcinek QT w obrazie EKG, występowanie omdleń oraz nagłej śmierci sercowej (SCD) [1,2].

Jak dotąd, odkryto 12 genów, których mutacje odpowiadają za występowanie zespołu LQT. Wszystkie geny kandydujące zlokalizowane zostały na autosomach, co sygnalizuje brak sprzężenia choroby z płcią. Geny, których mutacje powodują LQTS1 i LQTS2, kodują białka kanałów potasowych, natomiast LQTS3 jest skutkiem mutacji w genie kodującym białka kanałów sodowych. Genami tymi są: *KCNQ1* (*KvLQT1*), *HERG* (*KCNH2*) oraz *SCN5A* [3,4].

Nadrzędnym celem leczenia zespołu LQT jest zapobieganie epizodom zaburzeń rytmu serca i nagłego zatrzymania krążenia. Najważniejsze wydaje się określenie podtypu molekularnego tej jednostki chorobowej u osób z postawioną diagnozą ze względu na odmienne schematy leczenia w różnych podtypach LQTS. Powszechnie stosowanymi lekami z wyboru dla wszystkich pacjentów z zespołem long-QT są β-blokery, niemniej jednak ich skuteczność nie jest taka sama dla wszystkich podtypów LQTS.

Wprowadzenie terapii zależnej od genotypu okazało się przydatne w leczeniu poszczególnych odmian zespołu long-QT. W LQTS1 stosuje się nikorandil, który skraca odstęp QT. W LQTS2, z powodu dużej utraty potasu, stosuje się sole potasu i spironolakton. W LQTS3 skuteczne okazały się leki antyarytmiczne, takie jak lidokaina, meksyletyna, flekainid [1,3,5]. W sytuacji, gdy leczenie lekami β-adrenolitycznymi okazuje się nieskuteczne, pacjentom z LQTS3 zaleca się wszczepienie kardiowertera-defibrylatora [6].

Istnieją doniesienia, że 50–60% pacjentów posiadających LQTS ma genotyp LQTS1, 35–40% LQTS2, a najmniej (8%) genotyp LQTS3. Mutacje w LQTS1 i LQTS2 cechują się w prezentowanym fenotypie szybszym ujawnieniem się dolegliwości oraz niewielkim ryzykiem nagłego zgonu, u osób z LQTS3 objawy występują później, a ryzyko SCD jest duże [7].

Ze względu na częste niewystępowanie objawów klinicznych (aż u 40% nosicieli zmutowanych genów) bardzo ważna jest szybka i skuteczna diagnostyka. U pacjentów tych nie zawsze sprawdzają się kliniczne kryteria diagnostyczne, dlatego należy ich diagnozować metodami molekularnymi. Stwierdzenie zmiany okresu repolaryzacji w obrazie EKG może być przydatne we wstępnej diagnostyce, lecz powinno mieć kontynuację w skierowaniu na badania genetyczne.

Wczesne rozpoznanie zespołu long-QT jest istotne z powodu wysokiej śmiertelności wśród nieleczonych pacjentów z objawami (20% chorych umiera w ciągu roku od pierwszej utraty przytomności, 50% – po 10 latach od takiego epizodu) [3,7]. Nosiciele mutacji, u których choroba się nie ujawniła, mają 10%

ryzyko pojawienia się arytmii przed 40. rokiem życia, zwłaszcza gdy zażywają dodatkowo leki wydłużające odstęp QT lub są narażeni na czynniki inicjujące zaburzenia rytmu serca [8]. U nosicieli bezobjawowych genotypowa identyfikacja jest w pewnym stopniu ograniczona, gdyż nie wszystkie mutacje powodujące LQTS są rozpoznawalne genotypowo [7].

#### MOLEKULARNE METODY W DIAGNOSTYCE LQTS

##### 1. SSCP

SSCP (*single strand conformation polymorphism*), czyli analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA, jest jedną z najprostszych metod przesiewowych, która umożliwia wykrycie nawet niewielkich zmian w DNA, m.in. delecji, insercji, jednonukleotydowej substytucji i mikroinwersji oraz polimorfizmu genetycznego [9,10].

Technika ta opiera się na zdolności tworzenia przez jednoniciowe DNA unikalnych drugorzędowych konformacji przestrzennych, zależnych od sekwencji nukleotydowej, w związku z czym każda zmiana sekwencji następująca w wyniku mutacji lub polimorfizmu skutkuje zmianą w drugorzędowej strukturze cząsteczki, a następnie jej ruchliwości elektroforetycznej w środowisku żelu niedenaturującego [9,10,11].

Techniką SSCP badano geny obciążone mutacjami, kodujące np. podjednostki kanału sodowego (SCN4A). Scoggan i Bulman [11] do analizy SSCP używali niedenaturującego żelu, zawierającego 7,5% akrylamidu (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu wynosił 49 : 1), oraz buforu 0,5 × TBE w temperaturze 4°C. Reakcje amplifikacji prowadzono w warunkach standardowych, a do wyznakowania produktów PCR potrzebnych do analizy SSCP zastosowano [alfa-32P]-dCTP. Zasady, którymi kierowano się podczas projektowania primerów, dotyczyły odległości od granicy intron/ekson, która powinna wynosić co najmniej 20 nukleotydów. Według autorów, żaden starter nie powinien być skrajnie podobny do powtórzeń sekwencji DNA. Zastosowanie radioaktywnych nukleotydów znakowanych P32 wewnątrz produktów PCR pozwoliło na polepszenie rozdzielczości oraz redukcję artefaktów [11].

Zespół Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (SUM) [2] użył szczególnej odmiany metody, mianowicie mSSCP (wielotemperaturowy SSCP) do identyfikacji mutacji w genie *KvLQT1* odpowiedzialnej za LQTS1. Użyty

8% niedenaturujący żel (PPA) zawierał akrylamid i bisakrylamid w stosunku 37,5 : 1, bufor TBE oraz 5% glicerol.

Elektroforezę przeprowadzono w rosnącym gradiencie temperatury (4°C, 10°C, 25°C przez 2 godziny), co pozwoliło na lepszą analizę zmian w konformacji we fragmentach DNA, zależnych od temperatury. Do wizualizacji prążków wykorzystano barwienie solami srebra, elektroforegramy analizowano w systemie dokumentacji żelowej BASSYS1D (Biotec Fisher) [2].

Kolejnym przykładem analizy mSSCP wykonywanym przez tych samych badaczy [23,24] jest wykrywanie mutacji w genach *SCN5A* oraz *HERG* odpowiedzialnych za powstanie zespołu LQT3 i LQT2. Skład i proporcja żelu oraz warunki elektroforezy były takie same jak przy analizie genu *KvLQT1* [12,13].

Zespół badaczy pod kierownictwem Kapa [14] badał mutacje w genach odpowiedzialnych za LQTS1, LQTS2 i LQTS3. Analiza została przeprowadzona kolejno przy użyciu PCR, zautomatyzowanego sekwencjonowania DNA oraz bezpośredniego sekwencjonowania o wysokiej wydajności [14].

Mutacją w genie *SCN5A* powstała de novo związana z SIDS (*sudden infant death syndrome* – nagła śmierć noworodków), zajmował się zespół pod kierunkiem Wedekinda [15]. Do amplifikacji kodujących eksonów oraz granic ekson – intron genów *KCNQ1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1* oraz *KCNE2* użyto primerów znakowanych fluorescencyjnie. Uzyskane produkty analizowano przy użyciu A.L.F Express DNA Sequencer (Amersham Farmacia Biotech) połączonego z zewnętrznym urządzeniem kontrolującym temperaturę. Do produktów PCR dodano formamid i 0,01% roztwór błękitu bromofenolowego, następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze 98°C, po czym nakładano mieszaninę na 6% żel poliakrylamidowy (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu wynosił 99 : 1). Analizę eksonów przeprowadzono w 12°C i 18°C, a mutacje wykryto na podstawie różnic w szybkości migracji prążków porównywanych z typem dzikim [15].

Francuscy naukowcy pod kierunkiem Lupoglazoffa [16] również zajmowali się detekcją mutacji w tych samych genach. Reakcję SSCP prowadzono w temperaturze 7°C i 25°C. Gdy zaobserwowano prążki o innej ruchliwości, uzyskane fragmenty ssDNA poddano reamplifikacji i następnie sekwencjonowaniu z użyciem dideoksynukleotydów znakowanych

fluorescencyjnie. Analizy dokonywano z użyciem ABI Prism 377 [16].

Do badań nad mutacjami w genie *SCN5A* zespół Makita [17] posłużył się techniką SSCP. Eksony genu *SCN5A* zostały powielone w reakcji PCR, a następnie analizowane techniką SSCP. Produkty wykazujące zaburzoną konformację zostały poddane subklonowaniu z użyciem pGEMTeasy (Promega), po czym uzyskane klony poddano sekwencjonowaniu za pomocą ABI Prism 310 (Applied Biosystems) [17].

Badania nad przyczyną LQTS2 (mutacje genu *HERG*) prowadził zespół duńskich i norweskich naukowców kierowanych przez Larsena [18]. Analiza SSCP-HD (polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA połączony z analizą heterodupleksów) pozwoliła wykryć mutacje. Mieszanina oczyszczonych produktów PCR i roztworu formamidu po utrzymywaniu w temperaturze 98°C przez 5 minut, była następnie natychmiast przenoszona do kąpieli wodnej. Elektroforezę przeprowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym (5°C i 20°C przez 90 minut). Uzyskane prążki barwiono metodą srebrową, a następnie sekwencjonowano (ABI Prism 377) [18].

## 2. SEKWENCJONOWANIE

Sekwencjonowanie, w przeciwieństwie do wcześniej opisanej techniki SSCP, jest metodą bezpośrednią, mającą na celu ustalenie kolejności sekwencji nukleotydowej w badanym materiale DNA oraz porównanie otrzymanego ciągu nukleotydów z prawidłową sekwencją pod kątem wykrycia mutacji. Matrycę stanowi jedno- bądź dwuniciowy DNA, wcześniej powielany w reakcji PCR, o bardzo dużej czystości i dobrej jakości [19].

Do oczyszczenia matrycy DNA Scoggan i Bulman [11] użyli 1 µl egzonukleazy I (USB) oraz 1 µl alkalicznej fosfatazy (Roche Diagnostics GmbH). Do przeprowadzenia elektroforezy żelowej wykorzystali gotowy zestaw firmy USB (Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit), izotopowo znakowane dideoksy-terminatory [alfa-33P]-ddNTPs oraz 6% żel akrylamidowy.

Aby zsekwencjonować oba allele jednocześnie, eksony zawierające dodatkowe konformery ssDNA zostały powielone z genomowego DNA, bez izotopowego znakowania starterów. Otrzymany żel sekwencyjny poddano promieniowaniu X na 18 godzin w temp. - 80°C, po czym badano pod kątem zmian sekwencji. Aby pozbyć

się zbędnych szumów tła, autorzy zastosowali znakowane na końcach terminatory zamiast znakowanych na końcach starterów [11].

W sekwencjonowaniu wykonywanym przez zespół badaczy SUM [2,12], poszukujący mutacji w genach *KvLQT1* i *SCN5A*, produkty PCR analizowano przez sekwencjonowanie bezpośrednie. W reakcji używano nukleotydów znakowanych dRodaminą, a mieszanina reakcyjna (20 µl) zawierała: Terminator Ready Reaction Mix (PerkinElmer), startery (*reverse* lub *forward*), produkty PCR oczyszczone na kolumnach Microcon-100. Po reakcji znakowane nukleotydy, które nie inkorporowały w produkty PCR, były usuwane z roztworu (zastosowano Spin Column, Perkin Elmer). Sekwencjonator ABIPRISM 377 posłużył do oceny i dokumentacji otrzymanych sekwencji [2,12].

W poszukiwaniu mutacji genów odpowiedzialnych za LQTS badacze z Niemiec i Polski pod kierunkiem Haack [20] posłużyli się metodą sekwencjonowania. Produkty PCR po amplifikacji rozdzielono na niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, a następnie analizowano za pomocą ABI377. Warunki przeprowadzania cykli podczas sekwencjonowania dostosowano do wymogów zestawu firmy Promega [20]. Mutacji w genach *KCNQ1* oraz *KCNH2* poszukiwali również naukowcy chińscy [21], którzy użyli metody sekwencjonowania do poszukiwania przyczyn LQTS1 i LQTS2 [21].

Miller i wsp. [22] do oczyszczenia produktów PCR używali Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), które następnie mierzyli ilościowo przez elektroforezę żelową, korzystając z reagentów firmy Applied Biosystem. W analizie wykorzystano ABI Sequence Analysis software [22].

Do analizy sekwencyjnej genu *SCN5A* zespół Wedekinda [15] używał biotynylowanych primerów. Aby uzyskać jednoniciową matrycę, badacze wykorzystali kuleczki paramagnetyczne opłaszczone streptawidyną (Dynabeads M-280, Dynal). Opłaszczona na kulkach matryca była sekwencjonowana z zastosowaniem znakowanych fluorescencyjnie primerów, przy użyciu kitu (AutoRead T7 Sequencing Kit, Amersham Farmacia Biotech). Analizę sekwencyjną prowadzono za pomocą A.L.F. DNA Sequencer [15].

Zespół Chen i Zhang identyfikował mutacje w genie *KCNQ1* [23]. Odmienne konformacje ssDNA (dodatkowe prążki) uzyskane w wyniku analizy SSCP zostały wycięte bezpośrednio

z żelu, poddane rehydratacji oraz wytrząsaniu przez noc w temperaturze 55°C. Po elucji DNA z żelu został wykorzystany jako matryca do reakcji PCR (reamplifikacja). Amplifikowane produkty oczyszczono za pomocą QIAquick Purification Kit, a następnie poddano sekwencjonowaniu z użyciem starterów forward i reverse w aparacie ABI3100 Genetic Analyzer [23].

Singapurscy badacze pod kierunkiem Koo [24] analizowali mutacje w genach *KCNQ1*, *HERG*, *KCNE1* i *KCNE2* przez sekwencjonowanie z użyciem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, natomiast do analizy otrzymanych fragmentów zastosowali ABI Prism Model 3100 Avant Genetic Analyzer. Wyniki porównano z sekwencjami zawartymi w genetycznych bazach danych (GenBank), używając NCBI bl2seq Similarity Alignment Tool Program [24].

### 3. EKSPRESJA – TAQMAN-QRT-PCR

Metoda QRT-PCR (*quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction*), czyli łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, daje możliwość wykrywania i określenia liczby kopii mRNA analizowanych genów. Przewagą metoda ta zawdzięcza przede wszystkim szybkości i dokładności detekcji zmian w ekspresji genów zarówno w stanach fizjologii, jak i patologii [25,26].

Luo i Xiao [27] badali mutacje w genach *KCNQ1* oraz *HERG*. W dwustopniowej reakcji real-time RT-PCR użyto losowych primerów. Mieszanina reakcyjna pierwszej reakcji (*reverse transcription PCR*) zawierała: bufor RT, dNTP-y, primery, odwrotną transkryptazę (*multiscribe reverse transcriptase*), próbki RNA oraz wodę wolną od nukleaz. Warunki reakcji były następujące: 25°C przez 10 min i 36°C przez 120 min, aby uzyskać jednoniciowe cDNA. Do drugiej reakcji użyto następujących składników: TaqMan universal PCR master mix, wodę i próbki cDNA otrzymane w pierwszej reakcji. Warunki reakcji były następujące: 50°C przez 2 min., 95°C przez 10 minut, a następnie w 40 cyklach: 95°C przez 15 sek. i 60°C przez 60 sek. [27].

Badania prowadzone na końskich sercach przez Finley i wsp. [28] dotyczyły genu *KCNQ1* odpowiedzialnego za wystąpienie LQTS1. mRNA izolowane było z fragmentów przedsińka i komory za pomocą Fast Track Kit (Invitrogen). Mieszanina reakcyjna zawierała: primery, Tris-HCl, KCl, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, RED Taq

polimerazę. Reakcję prowadzono w 30 cyklach, składających się z wstępnej denaturacji (90 sek. w 94°C), przyłączenia primerów (90 sek., 65°C), wydłużenia (90 sek., 72°C). Qiaex II gel extraction kit (Qiagen) posłużył do pozyskania produktów z żelu, które następnie zostały poddane reamplifikacji i wklonowane do DH5a kompetentnych komórek z użyciem T7 i M13 starterów [28].

Miller i wsp. [22] przeprowadzili odwrotną transkrypcję, używając jednego z dwóch enzymów odwrotnej transkryptazy (Transcriptor RTase, Roche Applied Science lub cloned M-MLV RTase, Ambion). Losowo dobrane heksamety służyły jako primery dla odwrotnej transkryptazy. Reakcję prowadzono w dwóch etapach. Mieszanina reakcyjna dla I PCR zawierała: produkt reakcji odwrotnej transkrypcji jako matrycę, primery, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-y, bufor, betainę, polimerazę Taq (Continental Lab Products). W drugim etapie, jeżeli był konieczny, jako matrycę do reakcji PCR zastosowano fragmenty z pierwszego cyklu, użyto też gniazdowe startery i składniki jak w pierwszej rundzie. Startery zaprojektowane były przez VectorNTI software (Invitrogen) [22].

Kolejnym przykładem badań z użyciem QRT-PCR jest badanie ekspresji genów *KCNQ1* i *HERG*, przeprowadzone przez zespół badaczy SUM [29,30].

Oceny aktywności transkrypcyjnej badanych genów dokonano za pomocą dostępnego komercyjnie zestawu (TaqMan Gene Expression Assays Applied) z FAM na 5' końcu, a na 3' końcu posiadającego niefluorescencyjny wygaszacz. Reakcja QRT-PCR była jedno-stopniowa, mieszanina reakcyjna zawierała: QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix (HotStarTaq DNA Polimerazę, QuantiTect Probe RT-PCR bufor zawierający Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 8,7, dNTP mix i barwnik referencyjny ROX), QuantiTect RT Mix (QuantiTect Probe RT-PCR kit, Qiagen GmbH, Germany) oraz mieszaninę TaqMan Gene Expression Assay starterów i próbek (Applied Biosystems), matrycę RNA oraz wodę apirogeną. Reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzona była w 50°C przez 30 min w dwóch powtórzeniach. Należało zaktywować HotStart Taq Polimerazę w 95°C przez 15 min, by następnie przeprowadzić: denaturację w 94°C przez 15 sek., przyłączenie starterów w temperaturze 60°C przez 60 sek. oraz elongację w 72°C przez 10 min [29,30].

QRT-PCR został narzędziem, które umożliwiło analizę mutacji w genie *SCN5A* u transgenicznym myszy z LQTS [31]. Ilościowy RT-PCR wykonano przy użyciu ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem). Zmiany fluorescencji monitorowane były za pomocą SYBR Green PCR Supermix po każdym cyklu. Analiza krzywej topnienia odbyła się na końcu 40 cyklu po to, aby zweryfikować produkty PCR [31].

#### PODSUMOWANIE

Ważnym elementem diagnostyki zespołu LQT są badania przesiewowe (m.in. technika mSSCP), które pozwalają wykrywać mutacje w genach. Sporym utrudnieniem wydaje się heterogenność genetyczna, ujawniająca się

w poszczególnych podtypach LQTS, przez co trudno go określić.

Zidentyfikowano 12 genów kandydujących do miana odpowiedzialnych za występowanie zespołu long-QT [32]. Coraz większe zainteresowanie wzbudza szacowanie pojedynczych nukleotydowych polimorfizmów w genach związanych z LQTS [33]. Zdaniem Tomása i wsp. [34], polimorfizm genu *NOS1AP*, który może być powiązany z wydłużeniem odcinka QT w populacji, odgrywa rolę w modulowaniu prezentacji fenotypowej u pacjentów z LQTS [34]. Przydatną techniką okazuje się reakcja QRT-PCR, umożliwiającą ocenę ekspresji genów, której zmiany (wzrost i spadek) często powiązane są występowaniem zespołu long-QT. Techniki molekularne mają istotne znaczenie w diagnostyce chorób o podłożu genetycznym, do których zaliczany jest zespół long-QT, jednak by była ona pełna, należałoby zastosować je łącznie.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Szczeklik A., Tendera M. Kardiologia Tom I. Kraków: Medycyna Praktyczna 2009: 447–450.
2. Moric E., Herbert E., Mazurek U. i wsp. Gene is not a common target for mutations in patient with various heart pathologies. *J. Appl. Genet.* 2002; 43: 245–254.
3. Goldenberg I., Zareba W., Moss A.J. Long QT Syndrome. *Curr. Probl. Cardiol.* 2008; 33: 629–694.
4. Markiewicz-Łoskot G., Moric-Janiszewska E., Mazurek U. The risk of cardiac events and genotype-based management of LQTS patients. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 2009; 14: 86–92.
5. Crotti A., Celano G., Degradi F., Schwartz P.J. Congenital long QT syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 2008; 3: 18.
6. Zienciuk A., Lubiński A. Zespół wydłużonego QT – diagnostyka i leczenie. *Chor. Serca Naczyń* 2006; 3: 41–46.
7. Markiewicz-Łoskot G., Moric-Janiszewska E., Łoskot M., Szydlowski L. Wrodzony zespół wydłużonego QT – aspekty diagnostyczne. *Folia Cardiol.* 2005; 6: 403–411.
8. Napolitano C., Priori S.G., Schwartz P.J. i wsp. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 2005; 294: 2975–2980.
9. Słomski R. Analiza DNA – teoria i praktyka. W: Kaczmarek M., Hoppe-Gołębiewska J. Wykrywanie mutacji punktowych i polimorfizmu DNA metodą SSCP. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego 2008: 195–202.
10. Walker J.M., Rapley R. Medical Biometrics Handbook. W: Vorechovsky I. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Humana Press 2005: 73–77.
11. Potter N.T. Methods in Molecular Biology. Vol. 217 Neurogenetics – Methods and Protocols. W: Scoggan K.A., Bulman D.E. Single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) and sequencing for ion channel gene mutations. Humana Press 2003: 143–151.
12. Moric-Janiszewska E., Herbert E., Cholewa K., Filipecki A., Trusz-Gluza M., Wilczok T. Mutational screening of *SCN5A* linked disorders in Polish patients and their family members. *J. Appl. Genet.* 2004; 45: 383–390.
13. Moric-Janiszewska E., Węglarz L., Markiewicz-Łoskot G., Szydlowski L. Przydatność technik przesiewowych SSCP i DGGE w identyfikacji mutacji w zespole long-QT. *Farm. Przegl. Nauk.* 2010; 9: 29–37.
14. Kapa S., Tester D.J., Salisbury B.A. i wsp. Testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009; 120: 1752–1760.
15. Wedekind H., Smits J.P.P., Schulze-Bahr E. i wsp. De Novo Mutation in the *SCN5A* Gene Associated With Early Onset of Sudden Infant Death. *Circulation* 2001; 104: 1158–1164.
16. Lupoglazoff J.M., Cheav T., Baroudi G. i wsp. Homozygous *SCN5A* Mutation in Long-QT Syndrome With Functional Two-to-One Atrioventricular Block. *Circ. Res.* 2001; 89: e16–e21.
17. Makita N., Horie M., Nakamura T. i wsp. Mutation Drug-Induced Long-QT Syndrome Associated With a Subclinical *SCN5A*. *Circulation* 2002; 106: 1269–1274.
18. Larsen L.A., Andersen P.S., Kanters J. i wsp. Screening for mutations and polymorphisms in the genes *KCNH2* and *KCNE2* encoding the cardiac *HERG/MiRP1* ion channel: implications for acquired and congenital long-QT syndrome. *Clin. Chem.* 2001; 47(8): 1390–1395.
19. Słomski R. Analiza DNA – teoria i praktyka. W: Lipiński D., Pławski A., Słomski R. Przygotowanie produktów PCR do sekwencjonowania. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego 2008: 399–404.
20. Haack B., Kupka S., Ebauer M. i wsp. Analysis of candidate genes for genotypic diagnosis in the long QT syndrome. *J. Appl. Genet.* 2004; 45: 375–381.
21. Wenling L., Dayi H., Cuilan L. i wsp. Mutation analysis of potassium channel genes *KCNQ1* and *KCNH2* in patients with long QT syndrome. *Chinese Med. J.* 2003; 116: 1333–1335.
22. Miller T.E., You L., Myerburg R.J., Benke P.J., Bishopric N.H. Whole blood RNA offers a rapid, comprehensive approach to genetic diagnosis of cardiovascular diseases. *Genet. Med.* 2007; 9: 23–33.
23. Chen S., Zhang L., Bryandt R.M. i wsp. *KCNQ1* mutations in patients with a family history of lethal cardiac arrhythmias and sudden death. *Clin. Genet.* 2003; 63: 273–282.
24. Koo S.H., Ho W.F., Lee E.J.D. Genetic polymorphisms in *KCNQ1*, *HERG*, *KCNE1* and *KCNE2* genes in the Chinese, Malay and Indian populations of Singapore. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2005; 61: 301–308.
25. Wyczałkowska-Tomasik A., Żegarska J. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym – zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce medycznej. *Prz. Lek.* 2009; 66: 4.

26. Valasek M.A, Repa J.J. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 2005; 29: 151–159.
27. Luo X., Xiao J, Lin H, Lu Y., Yang B., Wang Z. Genomic structure, transcriptional control, and tissue distribution of HERG1 and KCNQ1 genes. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2008; 294: H1371–H1380.
28. Finley M.R., Li Y., Hua F. i wsp. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2002; 283: H126–H138.
29. Moric-Janiszewska E., Głogowska-Ligus J., Paul-Samojedny M., Węglarz L., Markiewicz-Łoskot G., Szydłowski L. Age- and sex-dependent mRNA expression of KCNQ1 and HERG in patients of Long-QT syndrome Type 1 and Type 2. *Arch. Med. Sci.* 2011; 31: 941–947.
30. Moric-Janiszewska E., Głogowska-Ligus J., Paul-Samojedny M. i wsp. Expression of genes KCNQ1 and HERG encoding potassium ion channels  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$  in Long-QT syndrome. *Kardiol. Pol.* 2011; 65: 1–30.
31. Wu L., Archacki S.R., Zhang T., Wang Q.K. Induction of high STAT1 expression in transgenic mice with LQTS and heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 358: 449–454.
32. Zhang T., Moss A., Cong P. i wsp. LQTS Gene LOVD Database. *Hum. Mutat.* 2010; 31: E1801–E1810.
33. Zaręba W. Counting mRNA in blood of LQTS – new direction? *Kardiol. Pol.* 2011; 69; 5: 430.
34. Tomás M., Napolitano C., De Giuli L. i wsp. Polymorphisms in the NOS1AP gene modulate QT interval duration and risk of arrhythmias in the long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55: 2745–2752.