

***MOLEKYLÆR GENETIK***  
-  
***MCAD DEFICIENS***  
-  
***NEONATAL SCREENING***

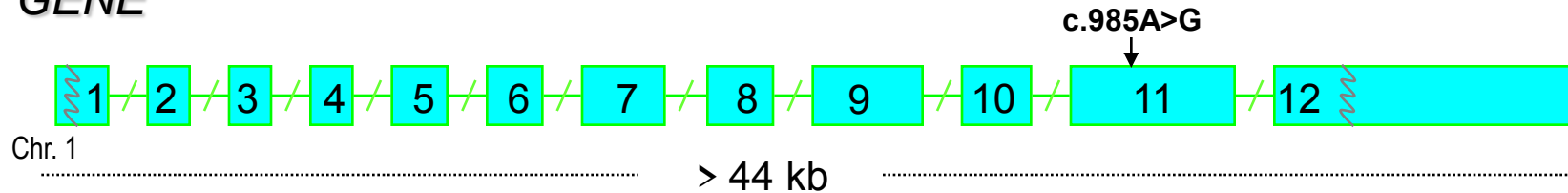
Brage Storstein Andresen

Molekylær Medicinsk Forskningsenhed, Skejby Sygehus  
og  
Institut for Biokemi og Molekylær Biologi,  
Syddansk Universitet

1. **MCAD deficiens er hyppig**  
**c.985A>G bærerfrekvens**

# Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD)

## GENE



## PROTEIN



**Prævalent mutation:** c.985A>G / K304E Bærerfrekvens i DK 1/100



Incidens: 1/40.000 homozygote

Patienter: 80% Homozygote 18% Heterozygote 2% No c.985A>G



**Forventet incidens: 1/32.000 (2 pr. år i DK)**

# Nyfødt screening for MCAD deficiens – Hvorfor?

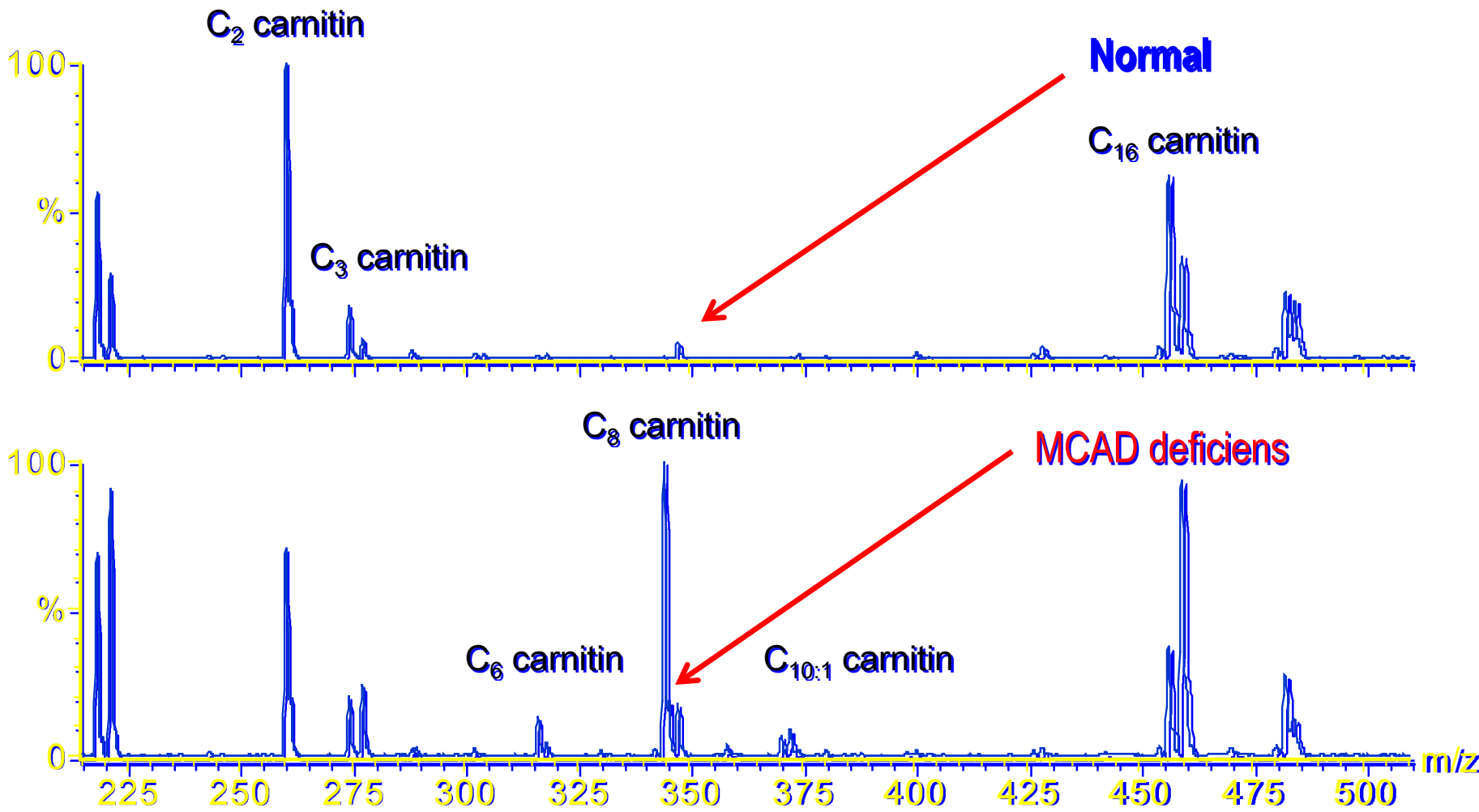
- 1. MCAD deficiens er hyppig  
c.985A>G bærerfrekvens**
- 2. Tidlig diagnose er vigtig  
Potentielt dødelig og invaliderende ved  
præsentation.  
  
”Behandling” mulig med god prognose**

# Nyfødt screening for MCAD deficiens – Hvorfor?

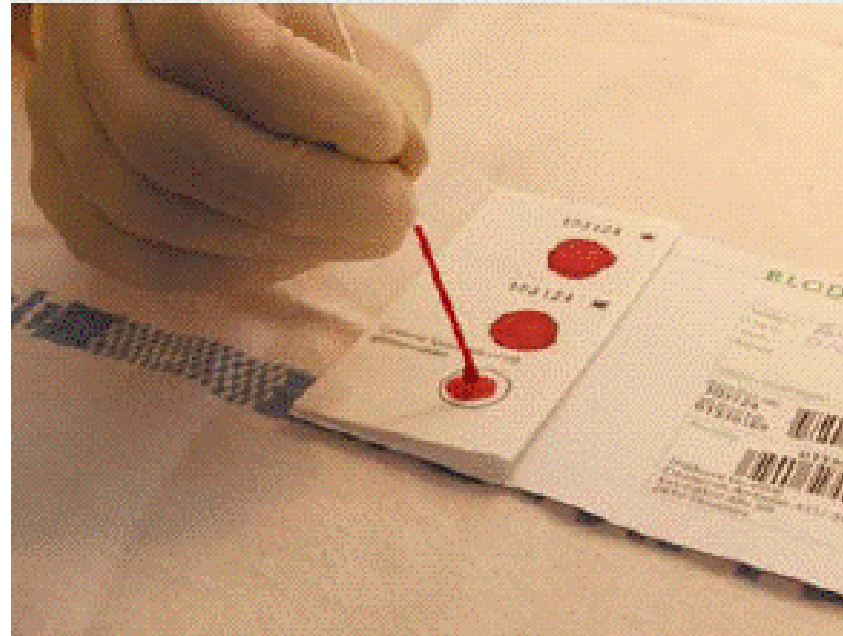
- 1. MCAD deficiens er hyppig**  
**c.985A>G bærerfrekvens**
- 2. Tidlig diagnose er vigtig**  
**Potentielt dødelig og evt. invaliderende ved**  
**præsentation.**  
  
**”Behandling” mulig med god prognose**
- 3. MS/MS analyse mulig**  
**C8-carnitin markør for MCAD deficiens**

# MS/MS diagnose af MCAD deficiens i blod spots

## Normal vs MCAD deficiens

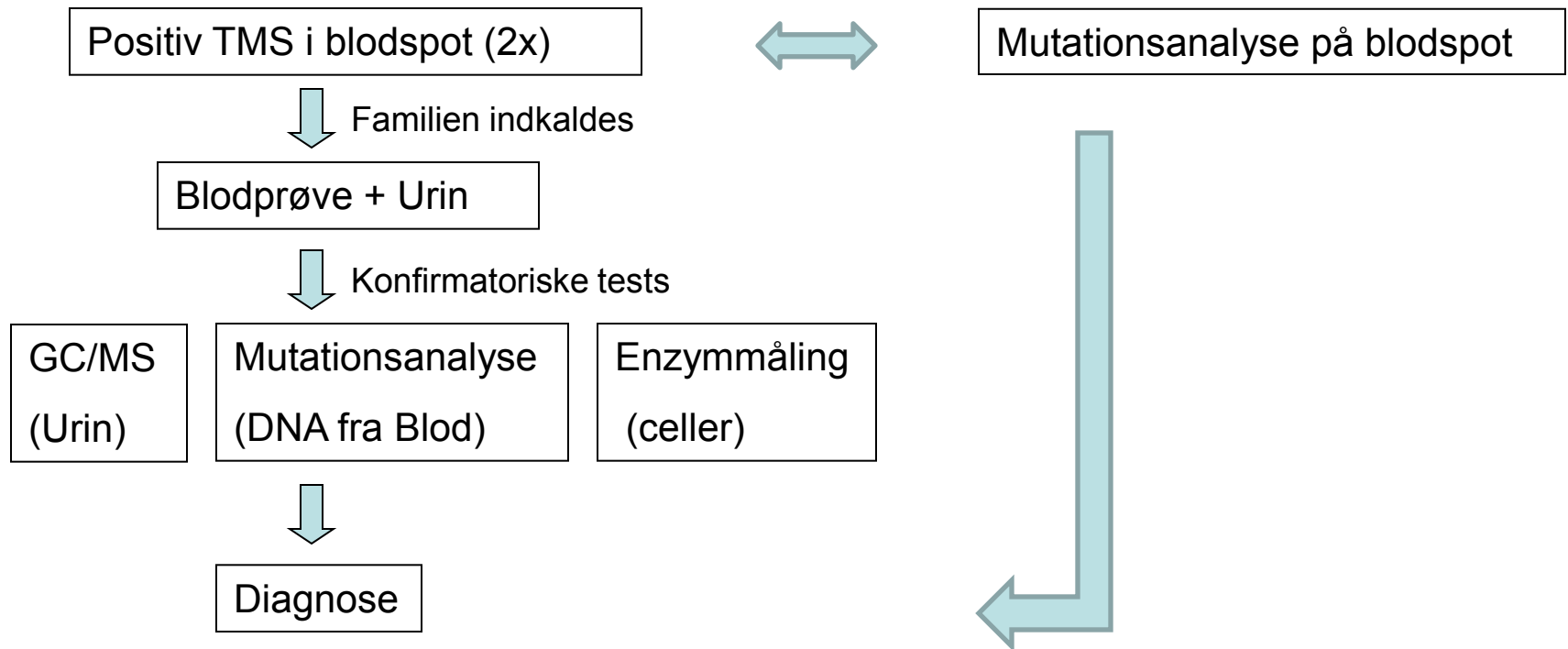


# Nyfødt screening for MCAD



1. I perioden 2002 -2009 frivilligt i Danmark (Pilot projekt – Skulle tilvælges)
2. Obligatorisk pr. februar 2009 i Danmark (Kan fravælges)
3. Alle ca. 65.000/år nyfødte i DK testes ved hæleprøve taget mellem 2-3 dage efter fødselen
4. Der tages ca. 75µl blod - Fordeles i tre cirkler – Sendes til SSI. Knappenålsstore punches er nok til MS/MS analyse .
5. Ved positivt resultat gentages og der sendes desuden punches til genetisk analyse.

## Diagnostisk procedure:





# Hvad skal vi med genetisk diagnostik?

## 1. Specifik diagnose

- A. Ingen celler eller urin -> Hurtig analyse på det originale blodspot
- B. Skelne mellem defekter med overlappende udskillelsesmønstre
- C. Større sikkerhed for korrekt diagnose

## 2. Familie undersøgelser

Detektion af bærere i familier / (prænatal diagnose) / Hurtig diagnose af næste barn

## 3. Forventede incidens

Kan estimeres ved hjælp af målte bærerfrekvenser for hyppige mutationer

## 4. Validering af TMS

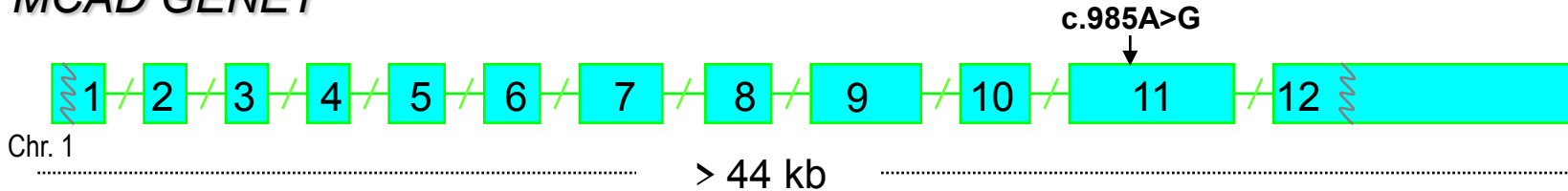
Forbedring/Evaluering af diagnostiske kriterier

## 5. Prognose?

Rådgivning om forventet forløb på basis af genotype-fænotype korrelation

# MCAD deficiens – Mutationsspektrum

## MCAD GENET



## PROTEIN



**Prævalent sygdomsfremkaldende mutation:** c.985A>G / K304E

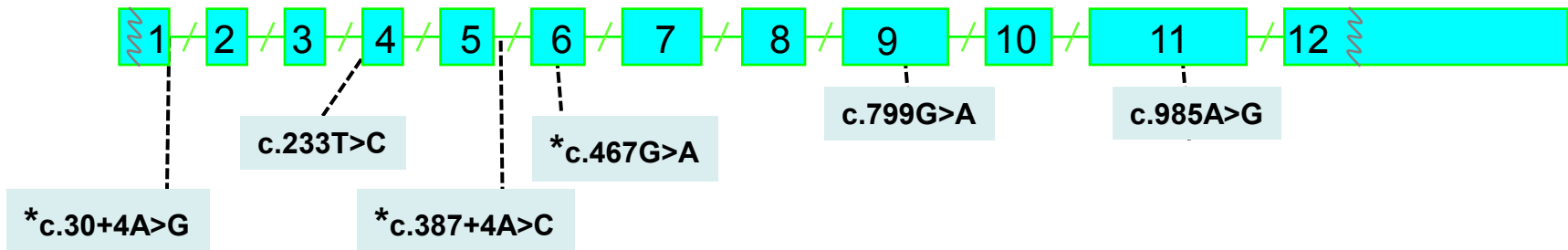
Patienter (klinisk præsentation - opsamlet i perioden frem til 2001):

Verden: **80%** Homozygote **18%** Heterozygote **2%** No c.985A>G

DK: **74%** Homozygote **16%** Heterozygote **10%** No c.985A>G

>150 forskellige mutationer kendt i dag  
(20 forskellige i DK)

Nogle mutationer er kun fundet i Danmark – (Endnu?)



## Forhøjede acylcarnitiner

c.985A>G assay:

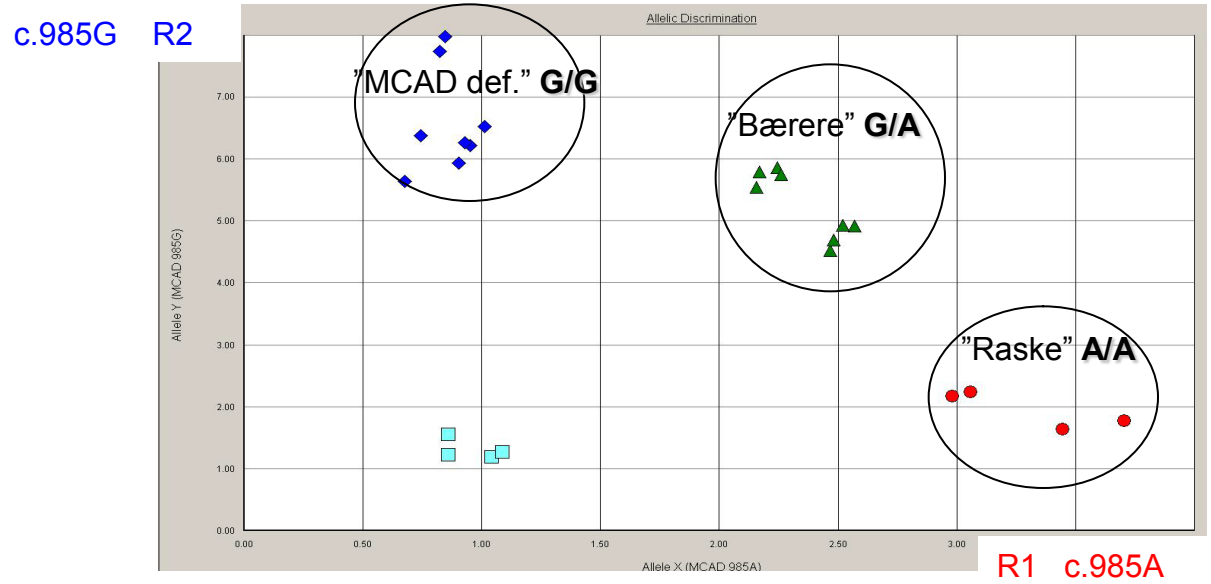
Kan udføres på det oprindelige blodspot

Tager 2 timer



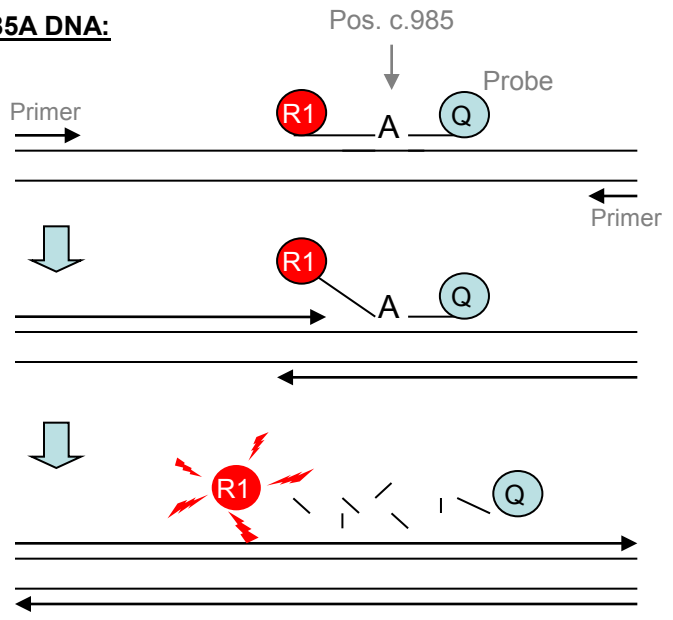
# Mutations-specifik test for MCAD c.985A>G

"OUTPUT"

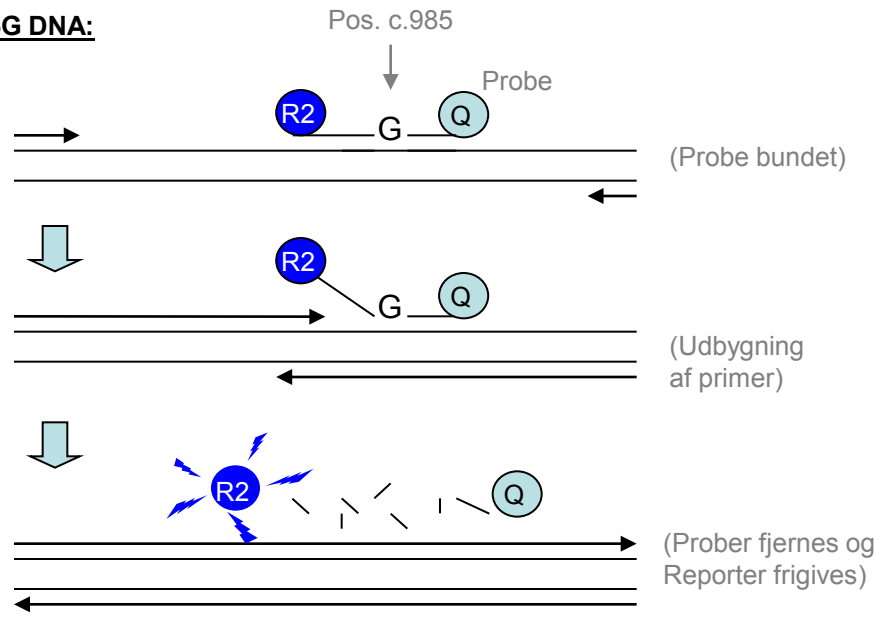


PRINCIP

**c.985A DNA:**



**c.985G DNA:**



**Forhøjede acylcarnitiner**

c.985A>G assay

**Homozygot c.985A>G**

↓ Familie undersøgelse

**Diagnose**

## Forhøjede acylcarnitiner

c.985A>G assay

Homozygot c.985A>G

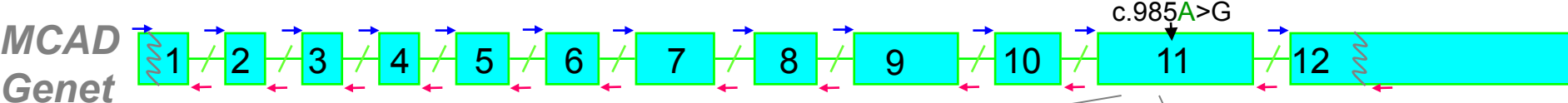
Heterozygot c.985A>G eller non c.985A>G

↓ Familie undersøgelse

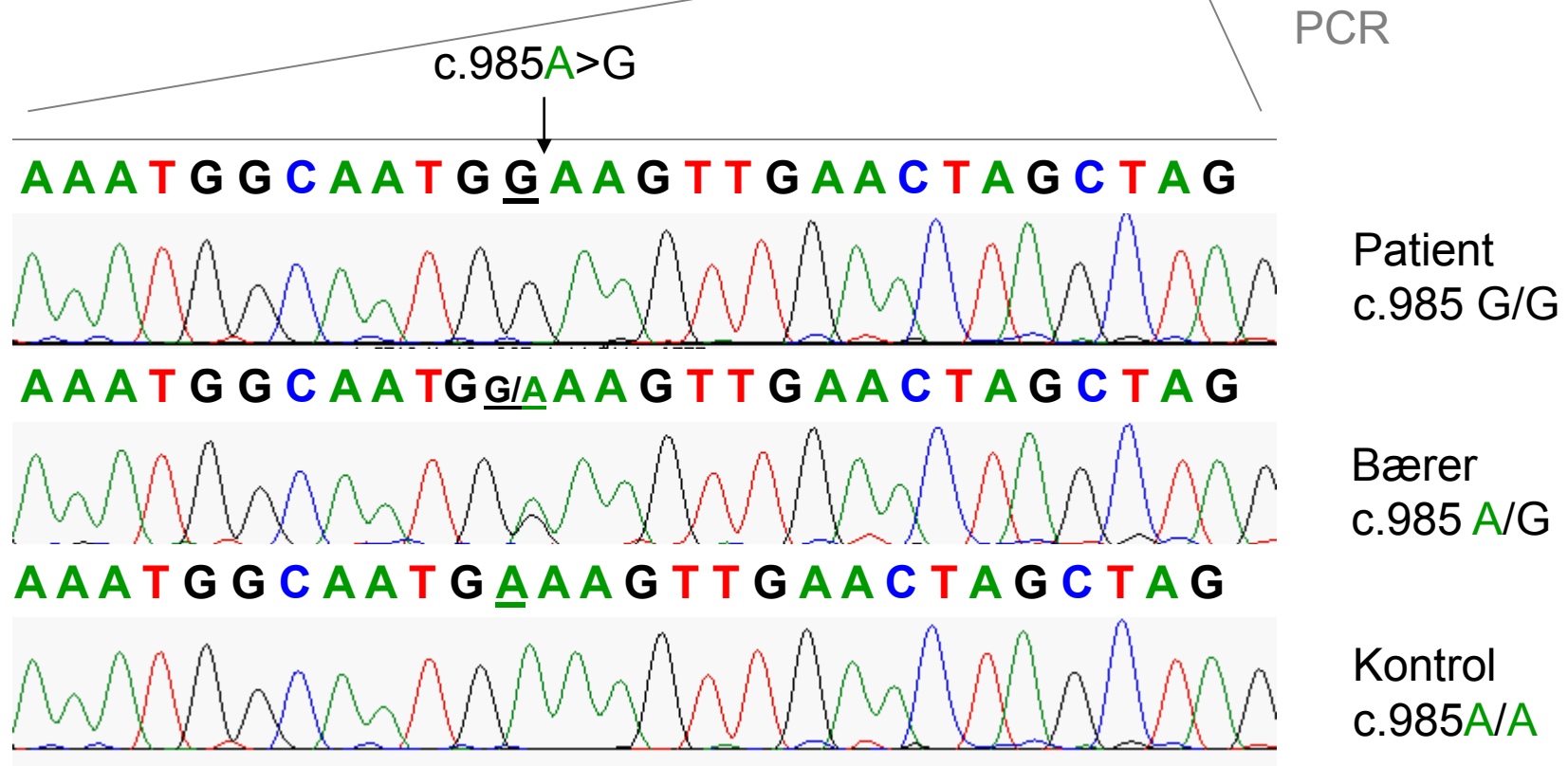
**Diagnose**

↓ Undersøge hele  
MCAD genen:  
Kan udføres på  
oprindelige spot  
På ca. 3 dage –  
Dog typisk en  
uge.

# Sekventering af MCAD genet



SEKVENTERING



**MUTATION**      AAA > GAA      (DNA)

                         Lys<sup>304</sup> > Glu<sup>304</sup>      (Protein/Enzym)



**Forhøjede acylcarnitiner**

c.985A>G assay

**Homozygot c.985A>G**

**Heterozygot c.985A>G eller non c.985A>G**

↓ Familie undersøgelse

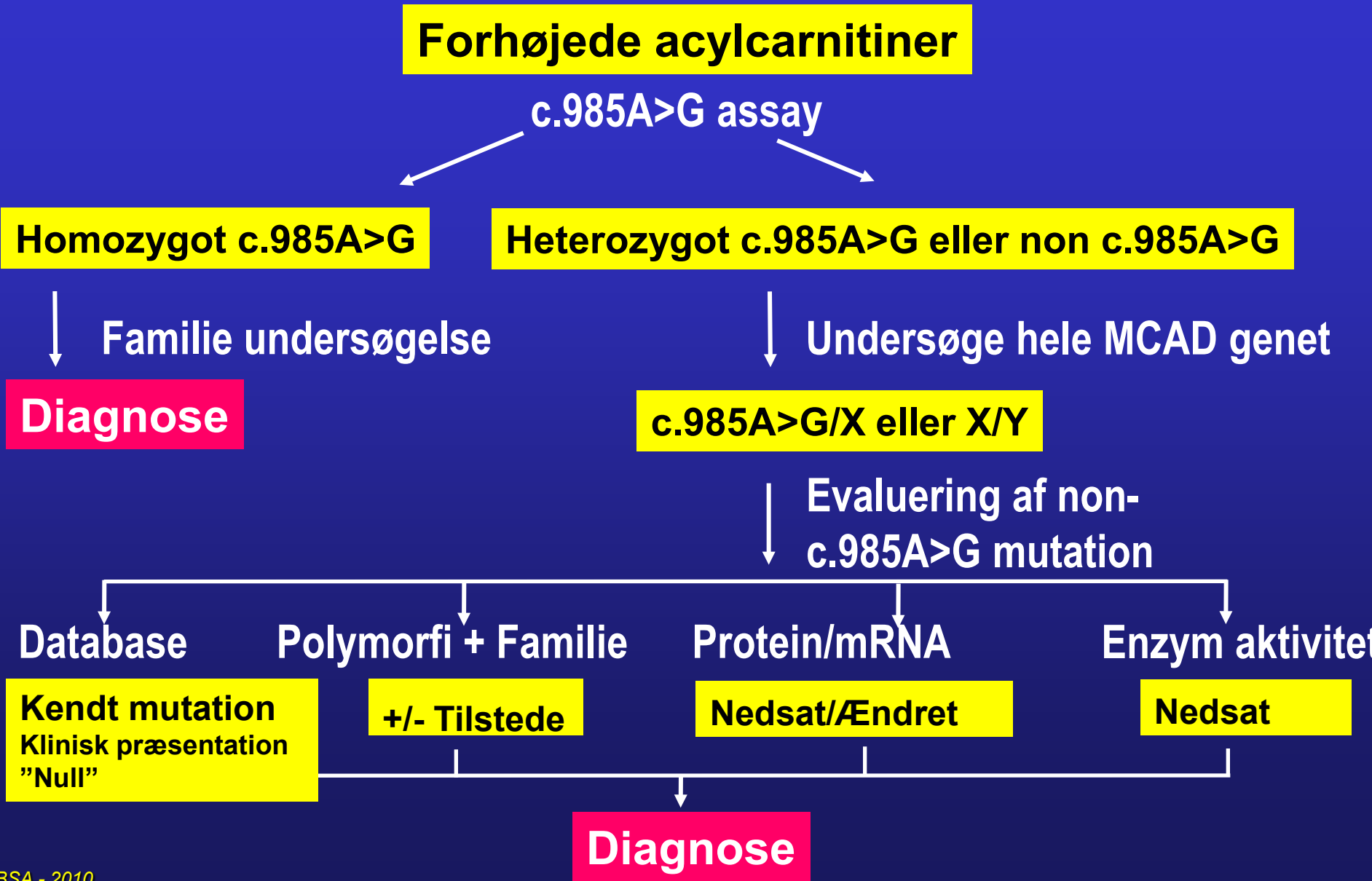
**Diagnose**

↓ Undersøge hele MCAD genet

**c.985A>G/X eller X/Y**

↓ Evaluering af non-  
c.985A>G mutation

# Diagnostisk strategi – Molekylær Genetik



**480.000 nyfødte screenet** pr. september 2010.

**53 positive prøver fundet.**

**Frekvens = 1/9.000**

**Forventet: 1/32.000**

**Forklaringer:**

**Falske positive?**

**Højere bærerfrekvens?**

**Lav penetrans?**

**Molekylær Genetik**

# MCAD – Genotyper i Danske screeningspositive

480.000 nyfødte 53 positive spots. Frekvens = 1/9000

<i>Genotype Pos. c.985</i>	<i>Patienter Kliniske Sympt.</i>	<i>Nyfødte (MS/MS)</i>
	% of total	% of total (Obs / Exp*)
G/G	79%	43.4% (23/12)
G/A	19%	30.2% (16/3)
A/A	2%	26.4% (14/1)
	>200 patienter	450.000 nyfødte
*c.985A>G Bærefrekvens : 1/100 i DK		

**c.985A>G bærefrekvens = 1/100 (1000 spots)**

**Beregnet incidens: 1/32.000 (1/40.000 Homozyg c.985A>G)**

**Alle c.985A>G homozygote bliver fundet med MS/MS**

**Der findes flere end forventet ???**

**Hvorfor 2x flere c.985A>G homozygote end forventet?**

**1. Bærerfrekvens højere end 1/100 ?**

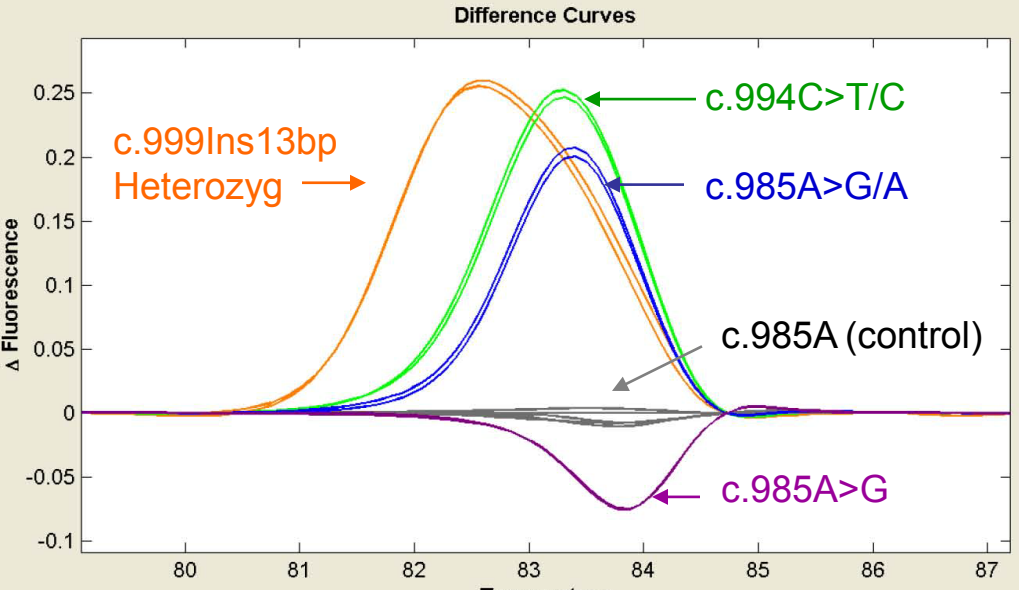
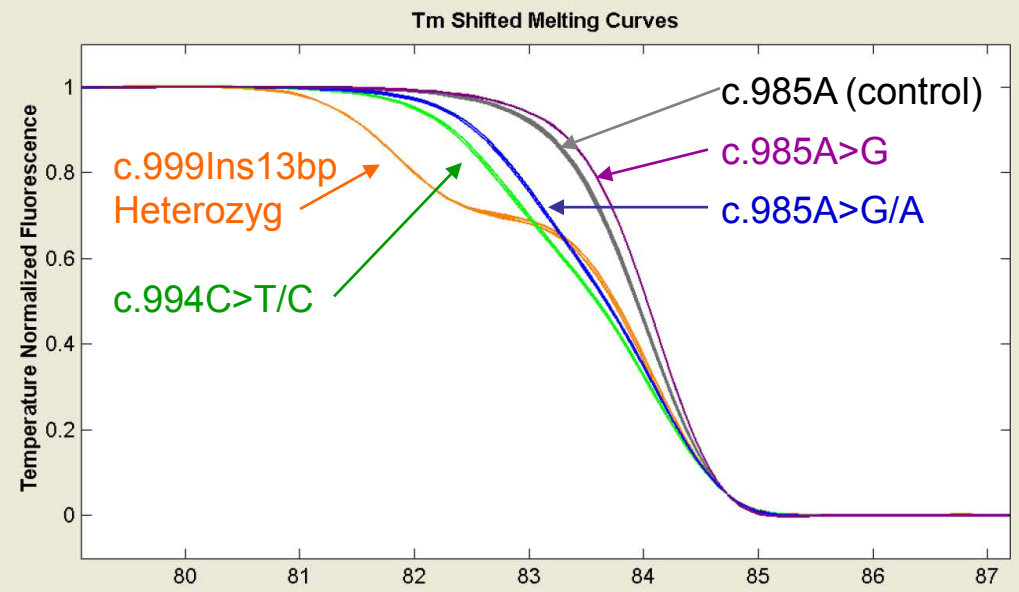
# Et nyt estimat for c.985A>G bærerfrekvens

## 1946 blodspot:

Heterozygote	No.	Freq.
c.985A>G:	19	1/102
c.999Ins13bp:	2	1/973
Combined:	21	1/92
c.994C>T:	3	1/649
(silent variation)		

Alle bekræftet ved sekventering

Men c.985A>G bærer - frekvensen er stadigvæk 1/100



Hvorfor 2x flere c.985A>G homozygote end forventet?

1. Bærerfrekvens højere end 1/100 ? **Nej**
2. Bærere føder flere homozygoter end forventet ?

Analysert 91 søskende til homozygote fra 49 familier:

25 c.985A>G

46 c.985A>G/A (Heterozygote/ Bærere)

20 c.985A

**Ingen overrepræsentation af c.985A>G homozygote**

3. Tilfældighed? Det må tiden vise !

# MCAD – Genotyper i Danske screeningspositive

480.000 nyfødte 53 positive spots. Frekvens = 1/9000

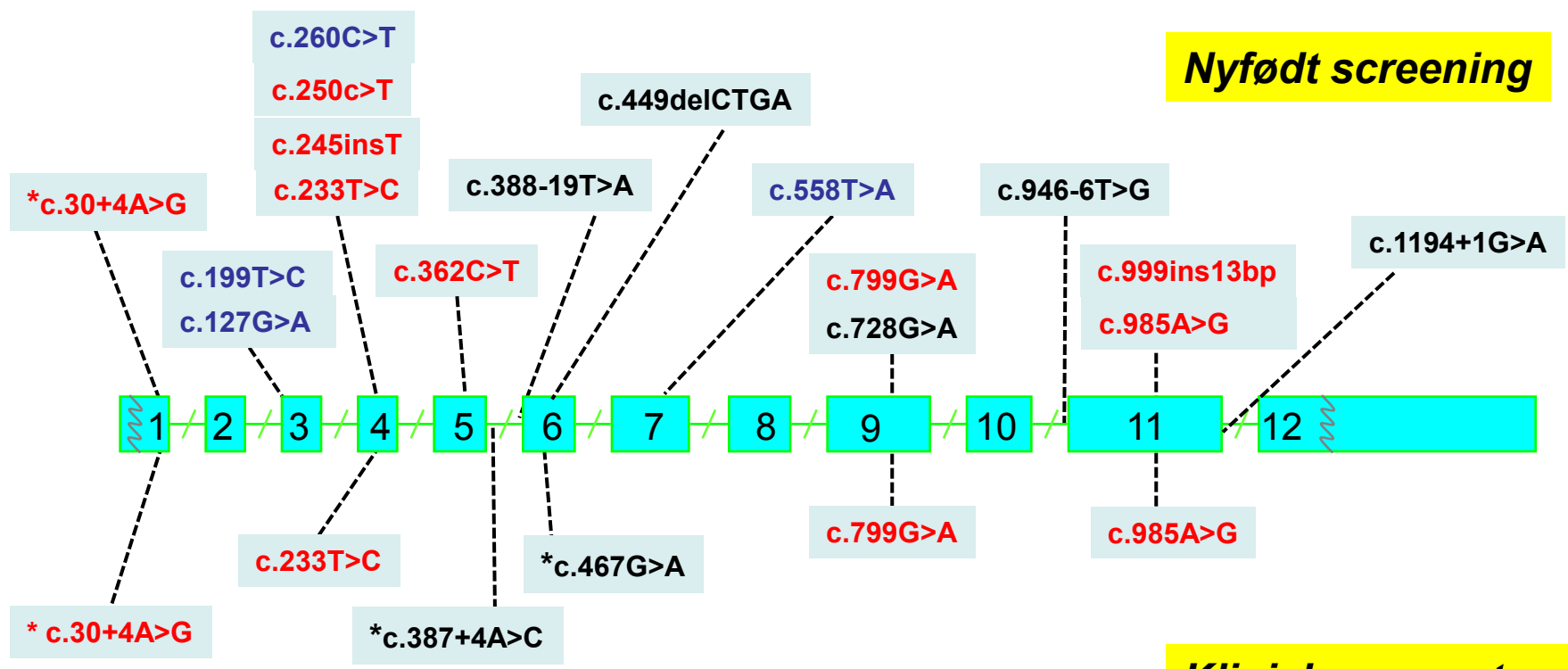
<i>Genotype</i> <i>Pos. c.985</i>	<i>Patienter</i> <i>Kliniske Sympt.</i>	<i>Nyfødte</i> <i>(MS/MS)</i>
	% of total	% of total (Obs / Exp*)
G/G	79%	43.4% (23/12)
G/A	19%	30.2% (16/3)
A/A	2%	26.4% (14/1)
	>200 patienter	450.000 nyfødte
*c.985A>G Bærefrekvens : 1/100 i DK		

Der findes mange flere end forventet med andre genotyper end homozygot c.985A>G.

Alle havde mutationer - Altså er det ikke "falsk positive".



# MCAD deficiens – Mutationsspektrum i DK.



**Nyfødt screening**

**Klinisk præsenderende**

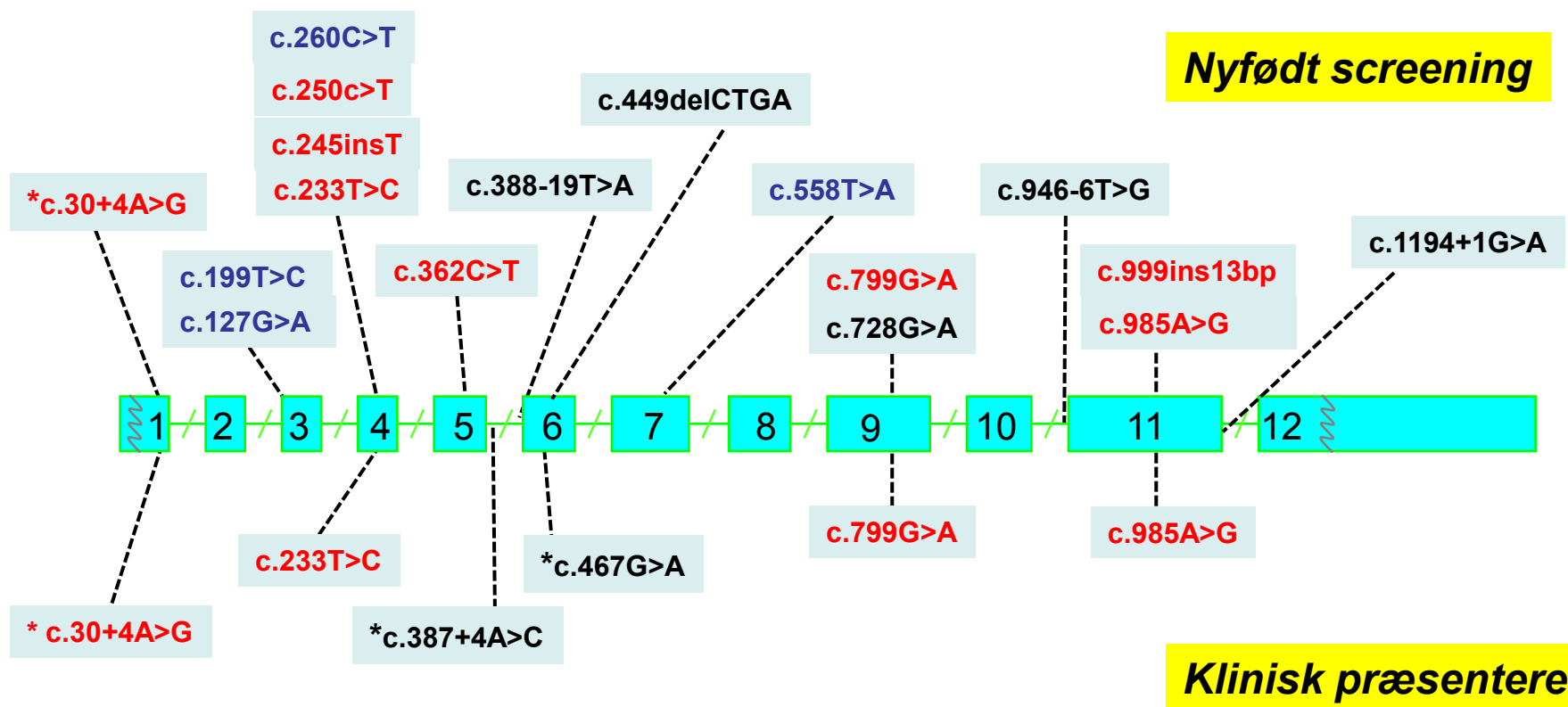
Kun fundet i nyfødte

Kun i klinisk præsenderende

Både i nyfødte og i klinisk præsenderende

Kun fundet i DK mærket med \*

# MCAD deficiens – Mutationsspektrum i DK.



**Nyfødt screening:**  
45 har genotyper som er set hos klinisk syge/Null -> Diagnose  
9 har genotyper som ikke er set hos klinisk syge.

## Andre landes MS/MS baserede screening:

c.985 Patients	US	Australia	Germany	UK	DK	
G/G	79%	63%	50%	47%	55%	43.4%
A/G	19%	34%	41%	32%	21%	30.2%
A/A	2%	3%	9%	21%	24%	26.4%
Frekvens:	1/15.000	1/17.000	1/8.450	1/10.000	1/9.000	

1. MCAD deficiens hyppigere end antaget
  2. MS/MS nyfødte har en større andel af andre genotyper end c.985A>G homozygot
- ”Milde” mutationer (f.eks. c.199T>C, c.127G>A, c.558T>A, IVS10-6T>G etc.)

# Genotype og C8-carnitine

	<u>Genotypes</u>	<u>Initial</u>			<u>Follow up</u>			<u>Number</u>
		<Mean>	Max	Min	<Mean>	Max	Min	n
<b>DEFINITE</b>	<b>c.985A&gt;G HMZ</b>	<b>2.48</b>	12.60	0.56	2.21	6.81	0.75	n=82
	c.985A>G/c799G>A	2.43	6.56	0.95	1.75	4.79	0.55	n=8
	c799G>A HMZ	1.82	4.31	0.61	1.27	2.37	0.46	n=5
	c.985A>G/FS	1.60	1.82	1.09	2.27	3.21	1.08	n=4
<b>UNCERTAIN</b>	<b>c.985A&gt;G/c.199T&gt;C</b>	<b>0.90</b>	1.74	0.64	0.81	1.36	0.15	n=10
	<b>IVS10-6T&gt;G HMZ</b>	<b>0.91</b>	1.47	0.51	0.62	1.10	0.25	n= 7
	<b>c.1237T&gt;C HMZ</b>	<b>2.02</b>	2.81	1.50	1.29	1.50	1.16	n= 3
<b>CARRIER</b>	<b>c.985A&gt;G (Carrier)</b>	<b>0.64</b>	<b>0.95</b>	<b>0.50</b>	<b>0.28</b>	<b>1.17</b>	<b>0.07</b>	<b>n=22</b>

**Har patienter med ”milde” genotyper nogen risiko for sygdom?**

Har patienter med "milde" genotyper **nogen risiko for sygdom?**

## *Genotype*

Homozygote c.985A>G:  
(>200 familier)

Andre genotyper:  
(>70 familier)

**Ingen genotype – fænotype sammenhæng hos patienter med MCAD  
deficiens – (Dog genotype – Biokemi sammenhæng)**

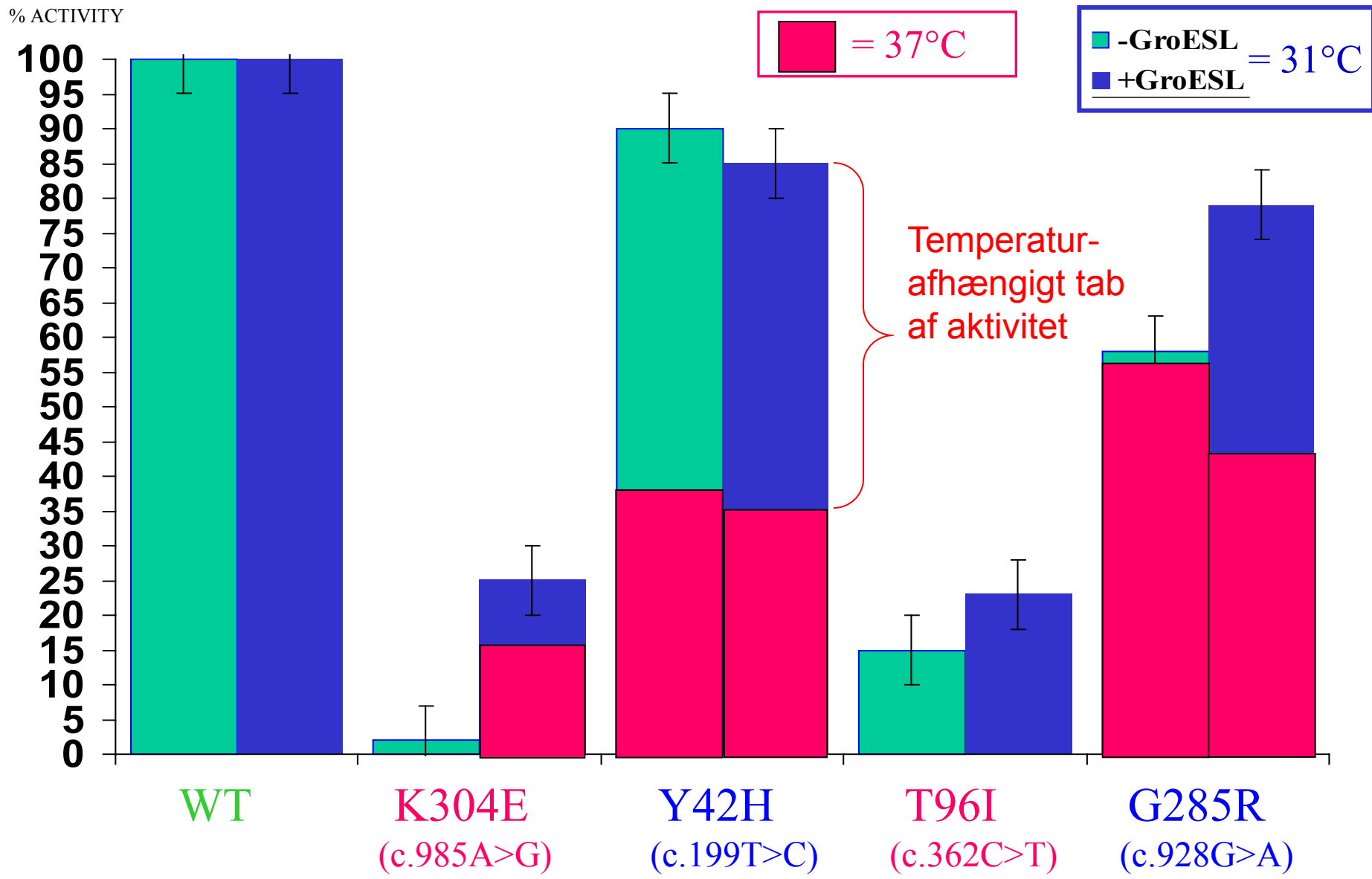
**Andre faktorer (faste, feber spiller en meget vigtig rolle)**

## *Fænotype*

Hele det kliniske spectrum  
(Asympt. > SUDS)

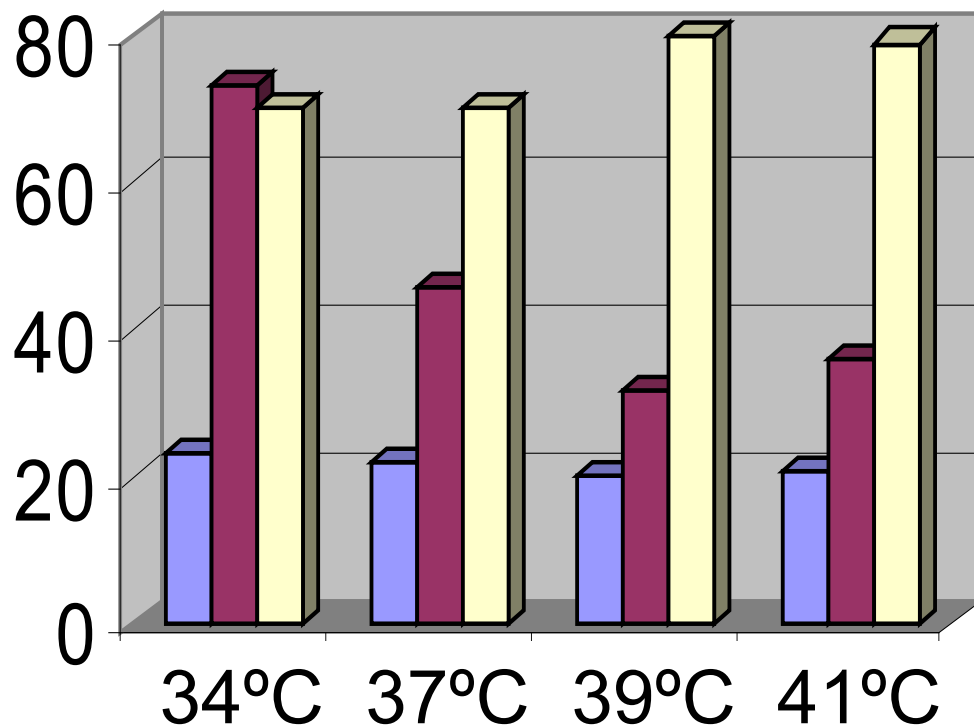
Hele det kliniske spectrum  
(Asympt. > SUDS)

# Funktionel test af c.199T>C (Y42H) ved ekspresion i *E.coli*



# Betaoxidation fra fibroblaster med c.199T>C (Y42H)

% of WT



Temperatúrafhængigt tab af aktivitet

- K304E/K304E
- K304E/Y42H
- K304E/WT

Temperatur

*(Udført af Simon Olpin  
Sheffield Children's Hospital, UK.)*



**Har patienter med ”milde” genotyper nogen risiko for sygdom?**

**Måske ! Men nok lavere risiko end de øvrige mere alvorlige genotyper  
Der er dog et betydeligt fald i MCAD enzym aktivitet ved feber**

**Totalt: 50 ”nyfødte” med c.199T>C på verdensplan – Ingen med symptomer**

- 1. MCAD deficiens er hyppigere end hidtil antaget**
- 2. Total antal personer med MCAD def. i DK = 71**
  - 18 fundet ved klinisk præsentation**
  - 53 fundet ved screening**
- 2. Langt overvejende andel har genotyper forenelige med diagnosen MCAD deficiens.**
- 3. En gruppe har "mild" MCAD def. (f.eks. c.199T>C mutation).  
Risiko for sygdomsanfald kan ikke udelukkes  
Differentieret rådgivning?**
- 4. Den molekylære genetik muliggør:  
Bedre, hurtigere og mere differentieret diagnostik af patienter og familiemedlemmer**

**Prænatal CVS / Navlestrengsblod analyser**

## Skejby Sygehus (MMF):

*Niels Gregersen*

*Margrethe Kjeldsen*

*Birthe Gahrn*

*Vibeke Stenbroen*

*Rikke K.J. Olsen*

*Peter Bross*