

# Zespół Liddle'a — opis przypadku i badań genetycznych

Liddle's syndrome — a case report and genetic diagnostics

Jacek Anioł<sup>1</sup>, Katarzyna Cedor<sup>1</sup>, Adam Buliński<sup>2</sup>, Teresa Nieszporek<sup>3</sup>, Andrzej Więcek<sup>3</sup>, Aleksander Sieroń<sup>1</sup>, Jerzy Chudek<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biologii Ogólnej, Molekularnej i Genetyki, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Patofizjologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Nefrologii, Endokrynologii i Chorób Przemiany Materii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

## Abstract

We present a case of a 52-year-old male with Liddle syndrome. The results of genetic studies and treatment in this condition is described.

**Key words:** monogenic hypertension, epithelial sodium channel, Liddle syndrome

Kardiol Pol 2012; 70, 7: 836–838

## WSTĘP

Zespół Liddle'a (LS) [1] należy do rzadkich monogenowych postaci nadciśnienia tętniczego dziedziczonych w sposób autosomalnie dominujący. LS jest uwarunkowany mutacjami w obrębie genu kodującego nabłonkowy kanał sodowy (ENaC), którego ekspresję stwierdzono m.in. w komórkach dystalnych i zbiorczych cewek nerkowych. ENaC jest zbudowany z 4 podjednostek, w tym z 2 podjednostek  $\alpha$ , podjednostki  $\beta$  i podjednostki  $\gamma$ . W LS wykryto różne mutacje genu kodującego podjednostkę  $\beta$  lub  $\gamma$  ENaC powodujące nieprawidłową sekwencję polipeptydową lub przedwczesną terminację translacji tych podjednostek [2]. Zmiany struktury podjednostek powodują upośledzenie ich procesu degradacji w wyniku zaburzenia ubikwitynacji, procesu rozpoczynającego proteosomalną proteolizę [3]. W następstwie tego obserwuje się stałą, nadmierną aktywację ENaC, która prowadzi do nasilonej resorpcji sodu w dystalnym odcinku nefronu, hiperwolemii i nadciśnienia tętniczego [2]. Charakterystyczną cechą fenotypową LS jest oporność na leczenie spironolaktonem, antagonistą receptora mineralokortykoido-

wego, przy zachowanej wrażliwości na stosowanie triamterenu i amiloridu, czyli leków blokujących ENaC [2].

Celem niniejszej pracy jest opis przypadku chorego, u którego podejrzewano obecność tego rzadkiego zespołu będącego przyczyną nadciśnienia tętniczego, oraz zmagarów zmierzających do wyjaśnienia podłoża molekularnego tej choroby.

## OPIS PRZYPADKU

Do Kliniki przyjęto 52-letniego otyłego (BMI 35,4 kg/m<sup>2</sup>) chorego, z 20-letnim wywiadem nadciśnienia tętniczego, z powodu przewlekłej hipokalemii utrzymującej się mimo leczenia spironolaktonem. Przy przyjęciu stwierdzono znaczną hipokaliemię (3,0 mmol/l) pomimo przyjmowania od 6 tygodni 200 mg spironolaktonu i 60 mmol potasu dziennie. Stosowane skojarzone leczenie przeciwnadciśnieniowe: amlodipina (10 mg), bisoprolol (5 mg), cilazapril (7,5 mg), klofidyna (3 × 150 µg) oraz monoazotan izosorbidu (100 mg) nie pozwalało na uzyskanie zalecanych wartości ciśnienia tętniczego.

## Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Jerzy Chudek, Katedra Patofizjologii, ul. Medyków 18, 40–752 Katowice, e-mail: chj@poczta.fm

Praca wpłynęła: 07.07.2011 r. Zaakceptowana do druku: 28.09.2011 r.

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

Przez ok. 15 lat chory leczył się nieregularnie, stosował najczęściej amlodipinę oraz enalapril, a wartości ciśnienia nie przekraczały 180/110 mm Hg i były dobrze tolerowane przez pacjenta. W ostatnim roku przed hospitalizacją w Klinice wystąpiły 2-krotnie przełomy nadciśnieniowe. W trakcie hospitalizacji z powodu przełomów stwierdzono znacznego stopnia hipokaliemię (2,63 mmol/l), w związku z czym uzupełniano niedobór potasu drogą dożylną. Z powodu towarzyszącej otyłości podejrzewano obecność zespołu Cushinga, jednak badania nie ujawniły istotnych zaburzeń czynności osi przysadkowo-nadnerczowej i zmian w nadnerczach w tomografii komputerowej. Pomiary aktywności reninowej osocza (0,2 ng/ml/h) i stężenia aldosteronu w surowicy (12,7 ng/dl) nie pozwoliły na jednoznaczne wykluczenie pierwotnego hiperaldosteronizmu (współczynnik aldosteronowo-reninowy 63,5). Podawanie doustne i dożylnie preparatów potasu umożliwiło okresową normalizację kaliemii.

Ojciec pacjenta chorował na nadciśnienie tętnicze i zmarł nagle z powodu zawału serca w wieku 57 lat (stężenie potasu w osoczu nie jest znane). Ciśnienie tętnicze i stężenie potasu w osoczu u 2 dorosłych synów jest prawidłowe (4,8 i 5,0 mmol/l).

W trakcie hospitalizacji w Klinice oznaczono stężenie aldosteronu po dożylnym obciążeniu izotonicznym roztworem chlorku sodu, obserwując jedynie niewielkie obniżenie jego stężenia do 9,2 ng/dl. Wobec nieskuteczności stosowanego uprzednio spironolaktonu w leczeniu przewlekłej hipokaliemii zastosowano suplementację potasu, po czym dodano amilorid w dawce 20 mg/24 h. Po tygodniu stosowania amiloridu stężenie potasu (bez suplementacji) wynosiło 4,2 mmol/l. Ciśnienie tętnicze znacznie się obniżyło, umożliwiając zmniejszenie liczby i dawek stosowanych wcześniej leków. Na tej podstawie rozpoznano LS (fenotypowo).

Od rozpoczęcia podawania amiloridu minęło ponad 6 lat. W trakcie obserwacji pacjenta w Przyklinicznej Poradni Nadciśnienia Tętniczego nie zanotowano kolejnych epizodów hipokaliemii, a leczenie nadciśnienia tętniczego jest skuteczniejsze.

### DIAGNOSTYKA GENETYCZNA

DNA genomowy uzyskano z leukocytów krwi obwodowej. Izolację przeprowadzono metodą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Sekwencjonowanie eksonów 13. podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$  ENaC przeprowadzono w Finlandii (prof. Kimmo Kontula, Uniwersytet Helsiński), nie ujawniając jednak żadnej mutacji (wyniki nieopublikowane). Mutacje w tym obszarze występują u ok. 90% chorych z LS.

Sekwencjonowanie wszystkich eksonów podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$  ENaC przeprowadzono na podstawie 28 par starterów zaprojektowanych za pomocą programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Do amplifikacji DNA zastosowano polimerazę FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) w stężeniu 1 j./25  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 66  $\mu$ g DNA genomowego i odpowiednią parę starterów w stężeniu 0,4  $\mu$ M.

Reakcję amplifikacji po wstępnym ogrzaniu w 95°C przez 5 min prowadzono wg następującego schematu: denaturacja w temperaturze 95°C przez 30 s, przyłączanie starterów w temperaturze 55°C przez 30 s, elongacja w temperaturze 72°C przez 60 s (33 cykle). Prawidłowe pod względem długości produkty oczyszczano, a następnie sekwencjonowano zgodnie z protokołem producenta sekwencjonatora kapilarnego (ABI PRISM 3130xl). Sekwencję badanego DNA porównywano z sekwencją DNA osoby zdrowej i bazą UniProtKB oraz opublikowanymi danymi [4, 5]. Badania te ujawniły wstępowanie pojedynczej heterozygotycznej mutacji zmiany sensu w obrębie eksonu 3 podjednostki  $\gamma$  (p.Glu197Lys c.591G>A) oraz 3 „milczących” polimorfizmów (podjednostka  $\beta$  ekson 2: p.Pro93Pro c.279C>T; podjednostka  $\gamma$  ekson 3: p.Tyr129Tyr c.387T>C, lleu158lleu c.474T>C) o heterozygotycznym charakterze.

Dalsze badania genetyczne objęły poszukiwanie zaburzeń procesu składania pierwotnego transkrypty. Materiał do badań uzyskano, pobierając wycinek skórny (ekspresja ENaC występuje również w gruczołach potowych). Otrzymany wycinek przepłukano 3-krotnie PBS wolnym od jonów wapnia i magnezu, po czym oddzielono naskórek od skóry właściwej po uprzedniej inkubacji w obecności dispazy (Gibco numer kat. 17105-041) o stężeniu 20 j./ml PBS, przez 20 min. Skórę właściwą pocięto na niewielkie skrawki. Skrawki zważono i niezwłocznie przystąpiono do izolacji RNA metodą wiązania uwolnionego z tkanki RNA do kolumnki krzemowej (zestaw RNeasy Mini Kit firmy Qiagen). Kontrolę jakości oczyszczonego RNA przeprowadzono metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przy użyciu 10 j. natywnej odwrotnej transkryptazy AMV (Eurx) w mieszaninie zawierającej 100 ng RNA oraz startery OligodT, którą inkubowano w temperaturze 42°C przez 15 min, a następnie przez 1 h w temperaturze 50°C. W reakcji syntezy cDNA wykorzystano swoiste startery zaprojektowane za pomocą programu Primer3. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z 2  $\mu$ l odpowiedniej pary starterów komplementarnych do cDNA ENaC  $\alpha$  lub ENaC  $\gamma$  (ENaCGCF i ENaCGCR) oraz pozostałe składniki reakcji PCR. Dotychczas przeprowadzone eksperymenty nie pozwoliły na uzyskanie cDNA podjednostek ENaC.

### OMÓWIENIE

Przedstawiony przypadek jest przykładem poszukiwań podłoża molekularnego choroby, które nie doprowadziły do wyjaśnienia jego przyczyny. Opisane dotychczas mutacje ENaC w LS dotyczyły najczęściej substytucji pojedynczego nukleotydu powodującego zmianę pojedynczego aminokwasu (najczęściej proliny w obrębie konserwatywnego motywu PY, kodony 611-623) lub skrócenia końca karboksylowego podjednostek  $\beta$  lub  $\gamma$ , spowodowanego mutacją nonsensowną lub przesunięcia ramki odczytu w wyniku insercji lub delecji pojedynczego nukleotydu [6, 7].

U badanego wykazano obecność pojedynczej mutacji w obrębie eksonu 3 podjednostki  $\gamma$  (p.Glu197Lys c.591G>A), która została opisana u chorych z idiopatycznymi rozstrzeniami oskrzeli [8]. Mutacja ta dotyczy domeny zewnątrzkomórkowej (p.80-523). Dotychczas nie opisano, aby mutacje zlokalizowane w tym obszarze powodowały zaburzenia transportu sodu w obrębie cewki dystalnej. Opisana mutacja nie zaburzała transportu sodu w gruczołach potowych i nabłonku dróg oddechowych u chorych z idiopatycznymi rozstrzeniami oskrzeli. Tym samym nie ma dowodu pozwalającego przypisać stwierdzonej mutacji związku z obrazem klinicznym LS.

W związku z powyższym założono, że przyczyną choroby może być zaburzenie procesu składania eksonów pierwotnego transkryptu jednej z podjednostek ENaC. Mutacje będące przyczyną zaburzeń składania eksonów podjednostki  $\gamma$  (318-1G-A i 1627delG) zostały opisane w jednej rodzinie obciążonej LS [9] i u chorego z mutacją *de novo* [10]. W celu weryfikacji tej hipotezy wyizolowano mRNA z tkanki podskórnej zawierającej gruczoły potowe. Uzyskanie tego materiału było mniej obciążające dla chorego niż wykonanie biopsji nerki czy bronchoskopii z pobraniem wycinka śluzówki oskrzela. Jednak przeprowadzone dotychczas badania nie doprowadziły do uzyskania produktu amplifikacji cDNA podjednostek ENaC. Tym samym podłoże molekularne nadmiernej, domniemanej aktywacji ENaC nie zostało wyjaśnione.

Mimo to chory jest poddany adekwatnej, skutecznej terapii obejmującej przewlekłe stosowanie amiloridu wraz z ograniczeniem podaży soli w diecie. Leczenie to wiąże się ze znacznymi trudnościami, gdyż lek nie jest dostępny w Polsce (tylko import docelowy).

Podsumowując, ustalenie podłoża molekularnego LS może być niełatwe i nie jest konieczne dla wdrożenia prawidłowej terapii.

*Badania sfinansowano ze środków przeznaczonych przez Śląski Uniwersytet Medyczny na badania własne (KNW-2-10/10).*

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

#### **Piśmiennictwo**

1. Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS. A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Am Assoc Physiol*, 1963; 76: 199–213.
2. Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M et al. Molecular biology of the amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Exp Physiol*, 1996; 81: 483–492.
3. Rotin D. Role of the UPS in Liddle syndrome. *BMC Biochem*, 2008; 9 [Suppl 1]: S5.
4. OMIM#600760 SCNN1B. <http://omim.org/600760>
5. OMIM#600761 SCNN1G. <http://omim.org/600761>
6. Schild L, Lu Y, Gautschi I et al. Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J*, 1996; 15: 2381–2387.
7. OMIM #177200 Liddle syndrome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/177200>
8. Fajac I, Viel M, Sublemontier S et al. Could a defective epithelial sodium channel lead to bronchiectasis. *Respir Res*, 2008; 9: 46.
9. Strautnieks SS, Thompson RJ, Gardiner RM et al. A novel splice-site mutation in the gamma subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families. *Nat Genet*, 1996; 13: 248–250.
10. Adachi M, Tachibana K, Asakura Y et al. Compound heterozygous mutations in the gamma subunit gene of ENaC (1627delG and 1570-1G>A) in one sporadic Japanese patient with a systemic form of pseudohypoaldosteronism type 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 9–12.