

Podłoże genetyczne rodzinnej kardiomiopatii przerostowej w czteropokoleniowej rodzinie – opis przypadku

Familial hypertrophic cardiomyopathy – a case report

Dorota Domal-Kwiatkowska¹, Grażyna Glanowska², Sławomir Smolik¹, Przemysław Wilczewski², Urszula Mazurek³, Ewa Nowalany-Kozielska², Marcin Fudal², Jan Wodniecki²

¹Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Farmaceutyczny, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

²II Katedra i Kliniczny Oddział Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

³Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Abstract

Genetic profile of four-generation family with hypertrophic cardiomyopathy is presented. The alterations in the MYH7 gene sequences were identified. Genetic background of familial hypertrophic cardiomyopathy is reviewed and discussed.

Key words: familial hypertrophic cardiomyopathy

Kardiologia Polska 2006; 64: 1287-1291

Wstęp

Rodzinna kardiomiopatia przerostowa (*familial hypertrophic cardiomyopathy*, FHCM) jest pierwotną chorobą mięśnia sercowego uwarunkowaną genetycznie [1]. Choroba jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący – w jednakowym stopniu dotyczy mężczyzn i kobiet. Stwierdzono, że tylko 50% potomstwa osób dotkniętych chorobą jest obciążone ryzykiem odziedziczenia genu i rozwojem HCM [2]. Do chwili obecnej wytypowano trzynaście genów, których mutacje prowadzą do asymetrycznego przerostu mięśnia lewej komory oraz wystąpienia objawów klinicznych choroby [3, 4]. Jedenaście spośród nich to geny odpowiedzialne za syntezę białek budujących sarkomer. Są to geny: łańcucha ciężkiego β -miozyny sercowej (MYH7) i α -miozyny sercowej (MYH6), sercowego białka C (MYBPC3), łańcuchów lekkich miozyny: istotnego i regulującego (MYL3 i MYL2), troponiny: T (TNNT2), I (TNNI3) i C (TNNC1), β -tropomiozyny (TPM1), tityny (TTN), sercowej aktyny (ACTC) [3, 4]. Pozostałe dwa to: gen kodujący podjednostkę γ -2 kinazy białkowej akty-

wowanej przez AMP (PRKAG2) i gen kodujący białko mięśni cytoszkieletu LIM (CLP) [3].

Zaobserwowano również wpływ innych dodatkowych zmian polimorficznych, np. w obrębie genu konwertazy angiotensyny (ACE), genu receptora typu pierwszego dla angiotensyny drugiej (AT1), genu angiotensynogenu (AGT) i genu endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS), na stopień przerostu mięśnia sercowego w kardiomiopatii przerostowej. U chorych z HCM charakteryzujących się nadmiernym asymetrycznym przerostem mięśnia lewej komory zaobserwowano np. częstsze występowanie polimorfizmu DD (delecja/delecja) w obrębie genu konwertazy angiotensyny (ACE) [5], polimorfizmu AC (substytucja zasad adenina/cytosyna) w pozycji 1166 w genie receptora typu pierwszego dla angiotensyny (AT1) [6] oraz zmian polimorficznych w eksonie 2 genu angiotensynogenu (AGT) będących efektem substytucji nukleotydo- wych (C521T i T704C) prowadzących do zamiany aminokwasów odpowiednio w pozycji T174M i M235T [7], albo polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnej w intronie 4.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Grażyna Glanowska, II Katedra i Kliniczny Oddział Kardiologii, ul. M. Skłodowskiej-Curie 10, 41-800 Zabrze, tel: +48 32 271 60 97, +48 601 533 644, e-mail: ggjanowska@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła: 08.02.2006. Zaakceptowana do druku: 25.04.2006.

genu endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS) (motyw nukleotydowy liczący 27 par zasad powtórzony cztery – allel a – lub pięć razy – allel b) [8].

W badanej czteropokoleniowej rodzinie z kardiomiopią przerostową typowano gen kodujący białka sarkomeru, w którym zmiany molekularne stały się przyczyną rozwoju rodzinnej postaci HCM. Badania genetyczne prowadzone technikami biologii molekularnej dotyczyły genów sarkomerowych związanych z najczęstszymi lub najgorzej rokującymi mutacjami – MYH7, TNNT2, MYBP-C3 oraz TPM1 [9, 10]. Dodatkowo poszukiwano zmian polimorficznych w genach modyfikujących obraz kliniczny choroby tzn.: w genie ACE, AT1, AGT oraz eNOS.

Materiał i metodyka

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Katowicach. Badanie obejmowało: badanie podmiotowe i przedmiotowe, badanie EKG (12-odprowadzeniowe, Simens Cardiostat 31), badanie echokardiograficzne (M-mode, 2-D, doppler, aparat Hewlett-Packard Sonos 1000), 24-godzinne monitorowanie holterowskie (aparat firmy Oxford). Od wszystkich przebadanych osób pobierano krew obwodową, z której część przeznaczano do badań biochemicznych, a część do analizy molekularnej. DNA izolowano z krwi obwodowej pobranej na EDTA przy użyciu zestawu DNAzol. Stosując technikę PCR, wyznaczano sposób dziedziczenia genu kandydującego do miana odpowiedzialnego za przerost mięśnia sercowego u chorych. Typowanie prowadzono na podstawie analizy polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych wewnątrz- i zewnątrzgenowych [11].

Amplifikację wybranych markerów mikrosatelitarnych dla genów sarkomerowych przeprowadzono w ter-

mocyklerze Gene Amp PCR SYSTEM (Perkin Elmer) w odpowiednim profilu temperaturowym. Otrzymane produkty reakcji rozdzielono w 6% żelu poliakrylamidowym (19:1) i wybarwiono solami srebra, a następnie oszacowano ich wielkość na podstawie systemu dokumentacji żelowej BASSYS1D (Biotec-Fischer). Kolejny etap badań obejmował poszukiwanie technikami PCR–SSCP, PCR–RFLP i PCR-sekwencjonowanie mutacji i polimorfizmów w wybranych eksonach genu kandydującego (eksony związane z wyjątkowo źle rokującymi mutacjami oraz mutacjami szczególnie często występującymi) [12].

W reakcji amplifikacji genów modyfikujących amplifikowano region obejmujący miejsce polimorfizmu insercyjnego-delecyjnego w genie ACE, miejsce polimorfizmu A1166C w genie AT1, regiony polimorficzne T174M i M235T w genie AGT i obszar polimorficzny w genie eNOS. Produkty amplifikacji genów obejmujące miejsca polimorficzne A1166C, T174M i M235T poddawano działaniu enzymów restrykcyjnych (odpowiednio HaeIII, Nco-I i Tth-I) i rozdzielano elektroforetycznie w 6% żelu poliakrylamidowym. Na podstawie ilości i długości otrzymanych produktów wyznaczono genotypy dla badanych miejsc polimorficznych [12, 13].

Wyniki

Przebadano czteropokoleniową rodzinę – wszystkich krewnych pierwszego stopnia (Rycina 1).

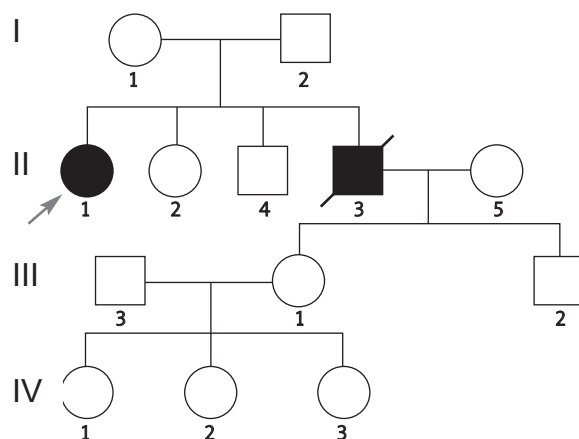
Badanie kliniczne

U probanda – lat 68 (II1) HCM rozpoznano w latach 80. Obecnie chora zgłasza upośledzenie tolerancji wysiłku (NYHA II). W badaniu przedmiotowym nie stwierdzono szmeru skurczowego nad sercem. W badaniu echokardiograficznym obserwowano asymetryczny przerost mięśnia lewej komory (grubość przegrody w rozkurczu wynosiła 23 mm, a grubość ściany tylnej 11 mm). W badaniu EKG występował rytm zatokowy, miarowy o częstotliwości 56 uderzeń na min, o cechach zaburzenia przewodnictwa śródkomorowego.

W kilkakrotnym 24-godzinnym badaniu EKG metodą Holtera nie stwierdzano groźnych komorowych zaburzeń rytmu, tylko liczne dodatkowe pobudzenia nadkomorowe oraz wstawki migotania przedsionków.

Brat probanda (II3), z rozpoznaną HCM, zmarł nagle w wieku 55 lat. W badaniach echokardiograficznych, podobnie jak u probanda, stwierdzano asymetryczny, średniego stopnia przerost mięśnia sercowego bez cech zawężenia drogi odpływu oraz niegroźne komorowe zaburzenia rytmu w badaniach EKG metodą Holtera (LOWN II).

U córki zmarłego brata probanda (III1) – lat 36, w wywiadzie występowały napadowe częstoskurcze nadkomorowe ustępujące po próbie Valsalvy. W bada-



Rycina 1. Drzewo genealogiczne badanej rodziny
kwadrat – mężczyzna, koto – kobieta, czarne pole – osoba chora,
przekreślony czarny kwadrat – osoba zmarła, strzałka – proband

niu echokardiograficznym nie obserwowano u niej cech HCM, a zapis EKG był prawidłowy.

U syna zmarłego brata probanda (III2) – lat 26, rozpoznano kilka lat temu nadczynność tarczycy oraz nadciśnienie tętnicze. W badaniu echokardiograficznym obserwowano nieznaczny koncentryczny przerost mięśnia lewej komory (grubość przegrody międzykomorowej w rozkurczu 14 mm, grubość tylnej ściany w rozkurczu 13 mm) oraz nieistotną hemodynamicznie niedomykalność zastawki aortalnej małego stopnia (+/++).

U pozostałych członków rodziny nie obserwowano ani klinicznych, ani echo- i elektrokardiograficznych cech HCM.

Analiza molekularna genów dla białek sarkomeru

Analiza genu kandydującego, odpowiedzialnego za chorobę w badanej rodzinie, z użyciem markerów mikrosatelitarnych sprzężonych z genami kandydującymi do miana odpowiedzialnych za HCM wykazała związek choroby z genem MYH7. Związek pozostałych genów kandydujących z chorobą w badanej rodzinie wykluczono. Wyniki przedstawiono w Tabeli I.

Z chorobą związany jest haplotyp 2-2 przenoszony przez probanda (II1). Badana (III1) otrzymała od zmarłego ojca (z rozpoznaną HCM) haplotyp 3-2 niezwiązany z występowaniem choroby. Żadne z jej dzieci (IV1, IV2, IV3) nie jest więc nosicielem zmutowanego genu. Brak

próbek krwi rodziców badanego (III2) uniemożliwia wykluczenie nosicielstwa genu.

Po wytypowaniu genu MYH7 i przeprowadzeniu analizy SSCP eksonów tego genu, związanych z wyjątkowo źle rokującymi mutacjami oraz mutacjami szczególnie często występującymi (eksony 9, 13, 20, 21), nie stwierdzono obecności zmian nukleotydowych w powyższych eksonach, w obrębie badanej rodziny.

Analiza molekularna genów modyfikujących fenotyp choroby

Analiza genów modyfikujących fenotyp choroby obejmowała amplifikację regionu obejmującego miejsce polimorfizmu insercyjno-delecyjnego w genie ACE, miejsce polimorfizmu A1166C w genie AT1, regiony polimorficzne w genie AGT (T174M i M235T) i obszar polimorficzny w genie eNOS zawierający sekwencję mikrosatelitarną obejmującą cztery (allel a) lub pięć (allel b) powtórzeń motywu liczącego 27 par zasad. Zestawienie informatywnych wyników dla badanych genów przedstawiono w Tabeli I.

Podsumowanie wyników i wnioski

W badanej rodzinie choroba prawdopodobnie jest związana ze zmianami w sekwencji genu MYH7. U probanda (II1) nie stwierdzono występowania niekorzystnych polimorfizmów w genach modyfikujących fenotyp HCM. U badanej (III1) wykluczono nosicielstwo zmutowa-

Tabela I. Analiza haplotypów dla markerów genetycznych sprzężonych z genem MYH7 oraz regionów polimorficznych w genie ATG (T174M), w genie ACE i genie eNOS

Nr*	Gen kandydujący MYH7		Geny modyfikujące fenotyp		
	Markery	Genotyp	Gen ATG (T174M)	Gen ACE	Gen eNOS
			Genotypy		
II1	MYH7PCR2	1 2	TM	II	ab
	AFM084ya1	1 2			
III1	MYH7PCR2	1 3	TM	DI	aa
	AFM084ya1	1 2			
III2	MYH7PCR2	1 2	TT	DD	ab
	AFM084ya1	1 2			
III3	MYH7PCR2	1 2	TT	II	bb
	AFM084ya1	1 2			
IV1	MYH7PCR2	2 3	TT	DI	ab
	AFM084ya1	1 2			
IV2	MYH7PCR2	1 3	TM	DI	ab
	AFM084ya1	1 2			
IV3	MYH7PCR2	2 3	TM	II	ab
	AFM084ya1	1 2			

*numer pokolenia i członka rodziny zgodny z opisem zamieszczonym na Rycinie 1.

nego MYH7, stwierdzono natomiast występowanie niekorzystnego genotypu aa dla genu eNOS. U badanego (III2) stwierdzono występowanie niekorzystnego genotypu DD dla genu ACE, natomiast brak próbek krwi od matki i zmarłego ojca uniemożliwia wykluczenie nosicielstwa zmutowanego genu MYH7. U badanych (IV1), (IV2) i (IV3) nie stwierdzono nosicielstwa HCM. U badanej (IV1) stwierdzono występowanie niekorzystnego genotypu TT w genie ATG w pozycji 174 zwiększającego o 50% ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego. Wszyscy badani posiadają genotyp AC dla genu AT1, który nie zwiększa prawdopodobieństwa rozwoju nadciśnienia i reakcji presyjnej na działanie angiotensyny u jego nosicieli.

Dyskusja

Większość zidentyfikowanych dotychczas mutacji została wykryta w genie MYH7, a zwłaszcza w jego eksonach: 9, 13, 20, 21. Ekson 13 określany jest jako gorące miejsce, ponieważ występujące w nim mutacje są związane ze szczególnie ciężką postacią choroby, charakteryzującą się znacznym stopniem przerostu mięśnia sercowego oraz wysokim ryzykiem nagłego zgonu [14–18]. Zlokalizowano w nim kilka mutacji, w tym: Arg403Gln, Arg403Trp, Arg403Leu, odpowiedzialnych za wysoki stopień penetracji choroby (blisko 100%) w danej rodzinie oraz nasilony stopień przerostu mięśnia sercowego [19].

W badanej rodzinie nie obserwowano zmian nukleotydowych w eksonie 13 w genie MYH7, co jednocześnie wyklucza obecność źle rokujących mutacji.

Na fenotyp choroby, poza mutacjami w genach związanych z syntezą białek sarkomeru, wpływ mają także tzw. geny modyfikujące [20]. Są to przede wszystkim geny związane z układem renina-angiotensyna-aldosteron. Badania genetyczne genu dla ATG wykazały obecność polimorfizmów w drugim jego eksonie: C→T w pozycji 521 i T→C w pozycji 704. Efektem jest zamiana treoniny w metioninę w pozycji 174 (T174M) oraz metioniny w treoninę w pozycji 235 (M235T). Polimorfizmy te zwiększają aktywność transkrypcyjną genu, co objawia się zwiększonym stężeniem angiotensynogenu u nosicieli allelu T substytucji M235T [7]. U kobiet będących homozygotami TT względem mutacji T174M występuje o 50% większe ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego. Zależności tej nie stwierdzono dla mężczyzn. Badania genu ACE wykazały w jego obrębie polimorfizm insercyjno-delecyjny, charakteryzujący się obecnością lub brakiem 287 par zasad w 16. intronie tego genu [5]. U homozygot DD stwierdzono większą aktywność enzymu konwertującego angiotensynę i zwiększoną reakcję presyjną w odpowiedzi na angiotensynę. Allel D jest czynnikiem ryzyka choroby niedokrwiennej i zawału mięśnia sercowego. Częstsze występowanie genotypu DD stwierdzono u pacjentów z przerostem lewej komory oraz kardiomiopatią przero-

stową i rozstrzeniową. Wykazano także, że genotyp DD genu ACE wpływa na zwiększoną ekspresję przerostu mięśnia u nosicieli patogenicznej mutacji Arg403Gln w genie MYH7 [21]. Jednocześnie nie stwierdzono takiej zależności u nosicieli mutacji w genie MYBPC3.

W badanej rodzinie genotyp DD genu ACE stwierdzono jedynie u syna brata probanda (III2), u którego w badaniu UKG obserwowano niewielkiego stopnia pogrubienie mięśnia lewej komory. Trudno jednak w chwili obecnej wnioskować o wpływie genotypu DD na przerost mięśnia sercowego u tego chorego. Problemem jest młody obecnie wiek badanego oraz występowanie chorób współistniejących (nadczynności tarczycy, nadciśnienia tętniczego) wymagających dalszej diagnostyki oraz obserwacji. W opisywanej w piśmiennictwie rodzinie z mutacją Arg780Lys w genie MYH7, z dużego stopnia przerostem mięśnia sercowego obserwowano występowanie towarzyszącego genotypu DD genu ACE [12].

Badania genetyczne genu AT1 wykazały obecność polimorfizmu A1166C w obrębie genu u pacjentów będących homozygotami względem allelu C [6]. Stwierdzono zmianę wrażliwości receptora na działanie angiotensyny II oraz większą częstość występowania tego allelu u osób z nadciśnieniem tętniczym. Badania genu eNOS wykazały obecność polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnej w czwartym intronie tego loci. Motyw nukleotydowy liczący 27 par zasad jest powtórzony cztery razy (allel a) lub pięć razy (allel b) [8].

W badanej rodzinie – z asymetrycznym przerostem mięśnia sercowego średniego stopnia, z nagłym zgonem brata probanda (II3) w 55. roku życia – wytypowaliśmy gen MYH7 jako odpowiedzialny za rozwój HCM. Stwierdziliśmy występowanie dwóch niekorzystnych polimorfizmów w genach modyfikujących: polimorfizm DD (delecja/delecja) dla genu ACE u syna brata probanda (III2) z niewielkim stopniem przerostu mięśnia sercowego oraz polimorfizm I/D (insercja/delecja) dla genu eNOS u zdrowej w chwili obecnej córki zmarłego brata probanda (III1). Niewątpliwie kluczowe dla rozpoznania HCM i określenia rokowania jest wytypowanie konkretnej mutacji w genie kandydującym oraz ewentualnego współistnienia genów modyfikujących. W prezentowanym konkretnym przypadku FHCM szczegółowa analiza molekularna pozwoliła na wykluczenie z dużym prawdopodobieństwem HCM u pozostałych badanych z rodziny probanda (z wyjątkiem syna brata probanda III2 – brak materiału genetycznego do badania).

Piśmiennictwo

1. Thaman R, Firoozi S, Hamid MS, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: management issues in the new millennium. *Cur Cardiol Rep* 2002; 4: 226-32.
2. Roberts R, Sigwart U. New concepts in hypertrophic cardiomyopathies, part I. *Circulation* 2001; 104: 2113-6.

3. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002; 82: 945-80.
4. Carniel E, Taylor MR, Sinagra G, et al. Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112: 54-9.
5. Stepanov VA, Puzyrev KV, Spiridonova MG, et al. Polymorphism of angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase genes in people with arterial hypertension, left ventricular hypertrophy, and hypertrophic cardiomyopathy. [Article in Russian] *Genetika* 1998; 34: 1578-81.
6. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, et al. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998; 32: 825-30.
7. Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, et al. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1997; 133: 184-9.
8. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996; 2: 41.
9. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 655-70.
10. Karibe A, Tobacman LS, Strand J, et al. Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis. *Circulation* 2001; 103: 65-71.
11. Domal-Kwiatkowska D, Smolik S, Glanowska G, et al. Zastosowanie analizy markerów mikrosatelitarnych w badaniach klinicznych kardiomiopatii przerostowej. *Kardiologia Polska* 2001; 55 supl.: 1-7.
12. Glanowska G, Domal-Kwiatkowska D, Smolik S, et al. Rodzinna kardiomiopatia przerostowa. Polimorfizm inercyjno-delecyjny genu konwertazy angiotensyny oraz receptora dla angiotensyny II. *Kardiologia Polska* 2005; 62: 445-8.
13. Domal-Kwiatkowska D, Smolik S, Nowalany-Kozielska E, et al. Analiza genów modyfikujących fenotyp rodzinnej kardiomiopatii przerostowej. *Kardiologia Polska* 2003; 59 supl.: 1-182.
14. Dausse E, Komajda M, Fetler L, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy. Microsatellite haplotyping and identification of a hot spot for mutations in the beta-myosin heavy chain gene. *J Clin Invest* 1993; 92: 2807-13.
15. al-Mahdawi S, Chamberlain S, Chojnowska L, et al. The electrocardiogram is a more sensitive indicator than echocardiography of hypertrophic cardiomyopathy in families with a mutation in the MYH7 gene. *Br Heart J* 1994; 72: 105-11.
16. Chojnowska L, al-Mahdawi S, Michalak E, et al. Nowa mutacja genu łańcuchów ciężkich β -miozyny sercowej – 403Arg \rightarrow Trp w rodzinnej kardiomiopatii przerostowej. *Kardiologia Polska* 1995; 42: 116-22.
17. Marian AJ, Roberts R. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92: 1336-47.
18. Domal-Kwiatkowska D, Smolik S, Mazurek U, et al. Zmiany genetyczne a obraz kliniczny rodzinnej kardiomiopatii przerostowej. *Wiad Lek* 2000; 53: 4-21.
19. Marian AJ, Mares A Jr, Kelly DP, et al. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *Eur Heart J* 1995; 1: 368-76.
20. Brugada R, Kelsey W, Lechin M, et al. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig Med* 1997; 45: 542-51.
21. Tesson F, Dufor C, Moolman JC, et al. The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 831-8.