

A myozin kötő C fehérje gén (MYBPC3) mutációjának azonosítása veleszületett süketnémasággal társult hypertrophiás cardiomyopathiában

Csanády Miklós, Sepp Róbert, Tóth Tímea, Orosz Andrea, Nagy Viktória, Hógye Márta, Forster Tamás
Szegedi Tudományegyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ

Identificarea mutației genei proteinei C de legarea miozinei (MYBPC3) în cardiomiopatie hipertrofică asociată cu surdo-mutism congenital

În 1987 grupul nostru a raportat un sindrom specific, în care cardiomiopatia hipertrofică (CMH) este asociată cu surdo-mutism congenital (Csanády et al, Eur Heart J, 1987). În probandul surdo-mut, CMH a fost diagnosticată la vârsta de 26 ani. Atunci, în primul screening familial s-a descoperit că trei dintre unchii paterni au manifestat boala, cu surdo-mutism la unul dintre ei. În cursul urmăririi de 27 ani, CMH s-a dezvoltat la trei frați ai probandului, cu pierderea marcată a auzului la nivelul cohleei la unul dintre ei, și două cazuri de moarte subită cardiacă. Familia a fost supusă unei analize genetice detaliate, care a inclus căutarea mutațiilor genelor sarcomerice și a genei 6 a miozinei (MYO6). S-a detectat o tranziție G/A pe prima poziție a intronului 7. Se presupune că mutația conduce la adăugarea unui aminiacid anormal după arginina de la poziția 273 (Arg273+1X) și activează un codon stop ascuns. Ultimul conduce la truncarea părții distale a proteinei. Mutația a fost prezentă la toți membrii familiei având fenotip HCM pozitiv. Adițional au fost descoperite trei purtători ai genei fenotip negativi.

Cuvinte cheie: cardiomiopatie hipertrofică, surdo-mutism congenital, examinări de genetică moleculară, proteina C de legarea miozinei

Identification of myosin binding protein C (MYBPC3) gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy associated with congenital deaf-mutism

A specific syndrome, in which hypertrophic cardiomyopathy (HCM) was associated with congenital deaf-mutism, was reported in 1987 by our team (Csanády et al, Eur Heart J, 1987). In the deaf-mute proband, HCM was diagnosed at age 26. The first family screening at that time revealed that three of the paternal uncles also manifested the disease, with congenital deaf-mutism in one. During the 27-year-long follow up, HCM developed in three brothers of the proband, with marked cochlear hearing loss in one of them, and two sudden cardiac deaths occurred. The family underwent detailed genetic analysis which included the mutation screening of the major sarcomeric genes and the unconventional myosin 6 gene (MYO6). A G/A transition at the first position of intron 7 was detected. The mutation presumably leads to addition of an abnormal amino acid after the last normal arginine in position 273 (Arg273+1X) and also activates a cryptic stop codon. The latter supposedly leads to the truncation of the distal part of the protein. The mutation was present in all the HCM phenotype positive family members. In addition three phenotype negative gene carriers were identified.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy, congenital deaf-mutism, molecular genetic examinations, myosin binding protein C

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (1): 23-25

www.orvstudert.ro

A hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) a szívizomzat primer megbetegedése, mely elsősorban a sarcomert kódoló génmutációk következtében alakul ki. A leggyakoribb 3 sarcomer fehérjét kódoló géndefektus: a béta myosin nehézláncot, a myosin kötő C fehérjét, valamint a troponin-T-t kódoló gének mutációja. A HCM egyes esetekben különböző szindrómák részjelenségeként jelentkezik (Andersen-Fabry-szindróma, Friedrich-szindróma, Noonan-szindróma stb.). Egy specifikus szindróma, ahol a HCM veleszületett süketnémasággal társult, 1987-ben került leírásra (Eur Heart J, 1987)[1], melyet a London Dysmorphology Data Base Csanády's 1987. Cardiomyopathy Deaf Mutism néven tart számon [2].

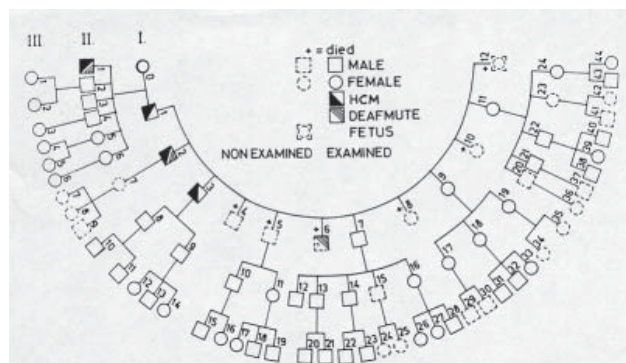
Jelen dolgozatunk célja e szindróma molekuláris genetikai okának tisztázása során elért eredményeink bemutatása.

Beteg és módszer

Munkánkban az említett veleszületett süketnémasággal társult HCM-ben szenvedő proband és családjának (1. ábra) klinikai és genetikai analizését végeztük el. A folyamatos követés során sorozatosan több alkalommal végeztünk echocardiographiás és EKG vizsgálatot. Az 1981-es első észlelésekor 26 éves, veleszületett süketnémaságban szenvedő proband atípusos mellkasi fájdalom miatt került kardiológiai észlelésre, kivizsgálása során típusos aszimmetrikus septum hypertrophia képében jelentkező, obstruktív HCM

igazolódtott. Az elvégzett coronarographia negatívnak bizonyult. A család 27 éves utánkövetése során négy generációt vizsgáltunk, a proband a második generációba tartozott. A családészítés vizsgálata a proband édesapjában és három nagybátyjában (I. generáció) is HCM-et igazolt, akik közül két esetben szintén veleszületett süketnémasággal társult a HCM. Az első generáció egyik tagja nemcsak süketnéma és szívbeteg, hanem mentálisan is retardált volt, intézetben gondozták és családot nem alapított [1].

Betegünk három testvérében (szintén II. generáció) is HCM kifejlődését észleltük az idők folyamán, egy betegben kifejezett cochleáris halláscsökkenéssel. A harmadik gene-



1. ábra. Az észlelt család eredeti három generációs családfája. (A férfi családtagokat négyzet, a női családtagokat kör szimbolizálja.) A hypertrophiás cardiomyopathiában szenvedő családtagokat a fekete kitöltés, a süketnémaságban szenvedőket sávozás jelzi (European Heart Journal 1987;8:528-534)

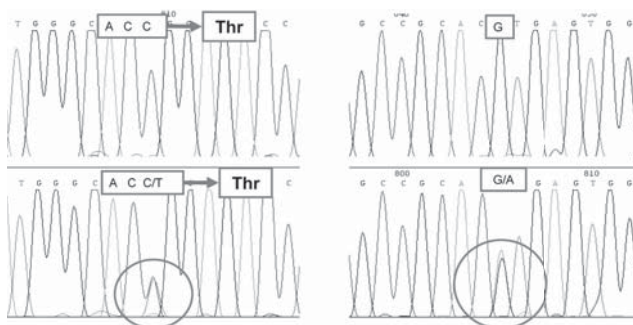


rációban kóros fenotípust még nem észleltünk, genetikai vizsgálattal azonban mutáció hordozókat igen. A negyedik generációról – bár a generáció nem minden tagját vizsgáltuk – még kevés molekuláris genetikai eredményünk van, nem találtunk kóros genotípust és fenotípust sem.

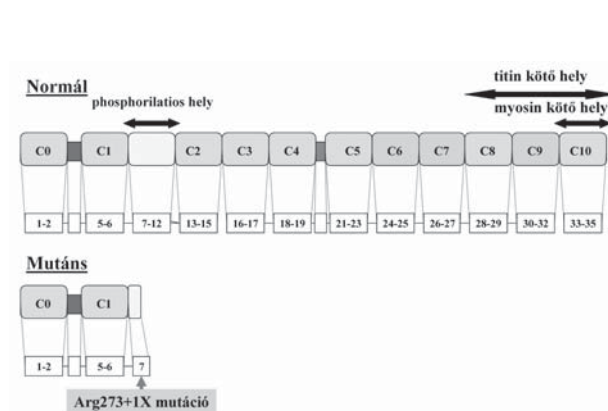
A genetikai analízis során a béta myozin nehéz lánc gén (MYH7), a troponin T (TNNT2), a troponin I gén (TNNI3), a nem-konvencionális myozin 6 gén (MYO6) és a myozin kötő C fehérje gén (MYBPC3) gén analízisét végeztük el. A gének exonjait polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk, a mutáció analízis single strand conformation polymorphism (SSCP) vagy denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) módszerrel történt. Az eltérő mobilitást mutató ampikonokat megszekvenáltuk.

Eredmények

A genetikai analízis a MYBPC3 gén 7-es exonjában igazolt eltérő mobilitást mutató ampikont. Az exon szekvenálása során a 7-es intron első nukleotidja szintjén egy G/A tranzíciót észleltünk (2. ábra), mely az Eco72I restriktív endonukleáz CACGTG felismerő helyét is érintette, a



2. ábra. A myozin kötő C fehérje gén 7-es exonjának szekvenálása, mely a 7-es exon és intron határán lévő, heterozigóta formában megjelenő guanin (G)/adenin (A) tranzíciót igazol.

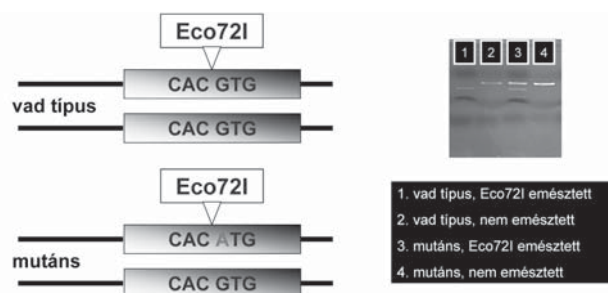


3. ábra. A MYBPC3 Arg273+1X mutáció feltételezett következménye. Tekintettel a rejtett stop kodon aktiválódására a mutáció következtében a fehérje 8-35 exonok által kódolt része, köztük a foszforilációs, a titin és myozin kötő részekkel, nem kerül lefordításra.

restriktív szitusz eltüntetésével. Utóbbi miatt a mutációt rost fragmens hossz polimorfizmussal is igazolni lehetett, a felismerési hely eltűnése következtében a mutáns DNS szál az enzim nem tudta elhasítani. A mutáció a konszenzus szekvenciában következik be, a donor szituszon, melynek mutációjával a 7-es intron nem kerül kivágásra az mRNS érése folyamán, és folytatódóan átírásra kerül. Az átírt intron szekvencia egy normálisan is átírt, a 274-es pozícióban lévő threonin-t (274Thr) tartalmaz, melyet a mutáció következtében nem ACG, hanem ACA kódol. A kóros szekvencia a 274Thr aminosav után egy stop kodont tartalmaz, melynél a transláció feltehetőleg leáll. Az utolsó normális aminosav a szekvenciában a 273-es pozícióban lévő arginin (273Arg) mely után a mutánsan kódolt Thr épül be (Arg273+1X). A mutáció következtében a fehérje 8-35 exonok által kódolt része, köztük a foszforilációs, a titin és myozinkötő részekkel, nem kerül lefordításra (3. ábra). A mutációt mind a négy HCM fenotípust mutató családtagnak (a proband testvérei illetve édesapja) ki lehetett mutatni, ezen kívül három tünetmentes génhordozót igazoltunk (a proband egy lánytestvére ill. két érintett testvér leánygyermek). Ez utóbbi, azaz a negyedik generációban sem észleltünk még kóros fenotípusra utaló jegyek kialakulását.

Megbeszélés

Az általunk a nyolcvanas években észlelt és 1987-ben leírt [1] London Dysmorphology Data Base-ben nyilvánított [2] családot azóta is követjük. A genetikai analízis a MYBPC3 gén 7-es exonjában igazolt eltérő mobilitást mutató ampikont. Az exon szekvenálása során a 7-es intron első bázispozíciójában egy G/A tranzíciót észleltünk (2. ábra), melyet Eco72I restriktív endonukleáz rost fragmens hossz polimorfizmussal is igazolni lehetett (4. ábra), ami egyszerűsítette a genotípus meghatározását. Ez azért volt szerencsés és fontos, mert a nagyszámú családban a továbbiakban nem kellett minden esetben nagyon költséges és munkaigényes szekvenálással igazolni a mutációt, hanem az egyszerűbb



4. ábra. A családtagok Eco72I restriktív endonukleáz fragmens hossz vizsgálata. A mutáns szál a restriktív hely elvesztése következtében nem kerül hasításra, az emésztetlen mintával azonos migrációs képet mutat. A normális szál a megtartott restriktív hely következtében két kisebb hosszúságú szárra emészthető. A mutáns mintában a heterozigotáságot jelzően mind a három szál (nem emésztett illetve emésztett fragmentumok), míg a normális mintában csak az emésztett két szál látszik.

restrikciós endonukleáz polimorfizmus vizsgálatával is elvégezhetjük a genetikai analízist, így módunk nyílt molekuláris genetikai információkat szerezni a család csaknem valamennyi tagjáról, pontosabban azokról, akiktől vért tudunk venni.

A mutációt minden pozitív fenotípus esetében igazolni tudtuk. Ezen túlmenően három, semmiféle kóros fenotípust nem mutató génhordozót is találtunk. A megfigyelési periódusban a mutációt hordozók közül két hirtelen szívhalál fordult elő. A prognózist általában kedvezőnek tartják MYBPC3 mutáció esetén; a hirtelen, ritmuszavar okozta halál relatíve ritka. Ennek ellenére a megfigyelési periódus során a családban a mutációt hordozók közül két hirtelen szívhalál is előfordult.

A csaknem három évtizedes követés során 3 esetben észleltünk típusos hypertrophiás cardiomyopathia kialakulását, ami azért nem meglepő, mert a myozin kötő protein C genetikai eltérése esetén a klinikai tünetek, illetve a szívizom megvastagodása a későbbi életkorban fejlődnek ki, és fiatal korban még nem észlelhetők a fenotípusra jellemző klinikai jegyek.

Egy esetben bakteriális endocarditis alakult ki és aorta- illetve mitralis műbillentyű beültetésére került sor.

A bemutatott molekuláris genetikai eredménynek azért van különös jelentősége, mert Mohiddin és munkatársai egy klinikailag hasonló család esetében az úgynevezett nem konvencionális myosin VI genetikai eltérését írták le [3]. Dolgozatukban hivatkoznak is munkacsoportunkra, mint a szindróma első klinikai leíróira. A most leírt genetikai analízisünk eredményei azonban ellentmondanak Mohiddin molekuláris genetikai eredményeinek, és az általunk észlelt családban a nem konvencionális myosin VI mutációját nem tudtuk kimutatni. Ezek szerint a két – klinikai hasonlóságot mutató – család molekuláris genetikai különbözőséget mutat.

Nem kétséges, hogy a hypertrophiás cardiomyopathiát a myosin kötő C fehérje mutációja okozza az általunk észlelt

családban. Felmerülhet azonban az a kérdés, hogy a hallászavart is a myosin kötő protein C fehérje okozza-e, vagy egy másik – esetünkben fel nem ismert – mutáció is fennáll, mely a hallászavarért felelős, ugyanis számos mutációt ismerünk, ami „nem szindrómás”, azaz izolált süketnémasághoz, illetve hallászavarhoz vezet [4]. Ez irányban további vizsgálataink vannak folyamatban, egyelőre valószínűnek látszik, hogy a myosin kötő C fehérje önmagában felelős a kórkép kialakulásáért.

Következtetések

Veleszületett süketnémasággal társult HCM esetében a myosin kötő C fehérje gén Arg273+1X mutációját azonosítottuk, mint a betegség kiváltásáért felelős molekuláris genetikai oki tényezőt.

Irodalom

1. Csanády M., Hőgye M., Forster T. - *Hypertrophic cardiomyopathy associated with congenital deaf-mutism*, Eur Heart J, 1987, 8:528-534.
2. Csanády M. - *Cardiomyopathy-deaf mutism*, 1987 London Dysmorphology database.
3. Mohiddin S.A., Ahmed Z.M., Griffith A.J. et al. - *Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6)*, J Med Genet, 2004; 41:309-314.
4. Nagy A. L., Csáki R., Tóth F. et al. - *Possibilities of early detection of hearing disturbances of genetic origin*, 8th International Congress of Mediterranean Society of Otolaryngology & Audiology Medimond Int. Proc 2006:15-18.