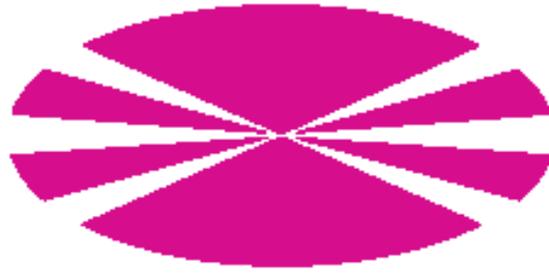


**UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL GEN *MyBPC3* EN PACIENTES CON
MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR**

**TESIS DOCTORAL
M^a Isabel Rodríguez García**

**DIRECTORES
Prof. Alfonso Castro Beiras
Dr. Manuel Hermida Prieto**

La Coruña, 2010

Dr. Alfonso Castro Beiras, profesor del Departamento de Medicina de la Universidad de La Coruña

Dr. Manuel Hermida Prieto, miembro del grupo de investigación cardiovascular (GRINCAR) de la Universidad de La Coruña

Hacemos constar:

Como Directores de la Tesis Doctoral que lleva por título “ANÁLISIS DEL GEN *MYBPC3* EN PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA FAMILIAR”, presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas, Dña. María Isabel Rodríguez García, que la mencionada Tesis Doctoral cumple todos los requisitos para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctor por la Universidad de La Coruña.

Y para que así conste firmamos el presente informe en La Coruña, a 1 de Julio de 2010.

Prof. Alfonso Castro Beiras

Dr. Manuel Hermida Prieto

A mi madre que ha sido siempre un ejemplo a seguir.

A mis hermanas porque juntas hemos caminado contra el viento.

A Víctor porque ha querido compartir su vida conmigo.

A mis hijos y a mis sobrinos porque son mi futuro.

A ellos porque les debo todo lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar esta Tesis Doctoral expresando mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han colaborado en ella:

En primer lugar quiero agradecer la oportunidad que me han brindado mis directores de Tesis, el Profesor D. Alfonso Castro Beiras y el Doctor D. Manuel Hermida Prieto, al acogerme en el grupo de investigación y permitir mi crecimiento profesional.

Al Prof. D. Alfonso Castro Beiras, por haberme permitido realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección, poniendo a mi disposición todo lo necesario. Su visión, adelantándose a los tiempos, y su generosidad, trabajando para abrirnos caminos a los nuevos investigadores, son dignas de mi más profunda admiración y agradecimiento.

Al Doctor D. Manuel Hermida Prieto, que sugirió el tema de esta investigación y lo ha dirigido con permanente dedicación. Le quiero agradecer también su apoyo desinteresado, su dedicación y la confianza depositada en mí. De él he aprendido a no tener miedo para afrontar los continuos cambios tecnológicos que se producen en las Ciencias Biomédicas.

Al Doctor D. Lorenzo Monserrat Iglesias, por su colaboración en la realización de esta Tesis Doctoral, en especial por el inmenso trabajo que ha supuesto el reclutamiento de los pacientes y su seguimiento en el tiempo. Su dedicación constante al trabajo y su afán de superación son un ejemplo a seguir.

Al Doctor D. Javier Muñoz García, por su gestión en el Instituto de Ciencias de la Salud, trabajando para que todo funcione con normalidad.

A la Doctora Dña. Lucía Núñez Fernández, por el apoyo, colaboración en la realización de la Tesis Doctoral y la amistad que siempre me ha ofrecido.

A todo el personal del Laboratorio por su disposición a la hora de ayudar, en especial a Laura e Inés porque juntas hemos recorrido un largo trayecto.

A todo el personal del Dpto. Clínico, en especial a Xusto Fernández y Elena Veira que participaron de manera activa en la selección de los pacientes que constituyen la cohorte de esta Tesis Doctoral y en la obtención de las muestras, respectivamente. Tampoco me quiero olvidar de D. Martín Ortiz y el Doctor D. Roberto Barriales Villa, por su colaboración en la obtención y análisis de los datos clínicos. Gracias a Silvana por su ayuda en la elaboración de los árboles genealógicos y por su buen talante.

Al Prof. Petros Syrris y al personal que tiene a su cargo por haberme acogido con cariño durante los dos meses que estuve en la University College of London realizando una estancia breve.

A Health in Code S.L, *spin off* de la UDC surgida del grupo de investigación GRINCAR, por su inversión en el desarrollo de la plataforma de genotipado para enfermedades cardiovasculares.

A todos los miembros del Departamento de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de A Coruña, y al personal del Instituto de Ciencias de la Salud, por su apoyo y colaboración durante estos años.

A todos mis amigos, que han estado a mi lado apoyándome constantemente.

A mi marido Víctor que, ha sabido comprender la importancia que para mí ha representado el poder realizar este proyecto. Espero que, tanto él como mis hijos Sergio y María, sepan disculparme por el tiempo que les he robado. Sin su comprensión, apoyo, tolerancia y amor no hubiese podido llevar a buen término esta Tesis Doctoral.

Por último, al ISCIII que, a través de la Xunta de Galicia, me concedió un contrato predoctoral que me ha permitido concluir esta Tesis Doctoral.

A todos GRACIAS

Lo que sabemos es una gota de agua.

Lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton

Matemático y Físico británico

(1642-1727)

ABREVIATURAS

ATPasa: Adenosín trifosfatasa.
ACV: Accidente cerebro-vascular.
ADN: Ácido dexosirribonucleico.
ADP: Adenosín difosfato.
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
ASSP: *Alternative Splice Site Predictor*.
ATP: Adenosín trifosfato.
CLE: Cadena ligera esencial de la miosina.
CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.
CLR: Cadena ligera reguladora de la miosina.
C-terminal: Carboxi-terminal.
cTnC: Troponina C cardiaca.
cTnI: Troponina I cardiaca.
cTnT: Troponina T cardiaca
dbSNP: Base de datos pública *Single Nucleotide Polymorphisms*.
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.
DTCS: *Dye Terminator Cycle Sequencing*.
ECG: Electrocardiograma.
ECO: Ecocardiografía.
EDTA: Solución de sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético.
Fn: Fibronectina.
Fw: Forward.
HGMD: The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff.
HSF: *Human Splicing Finder Splice site analysis*.
HTA: Hipertensión arterial.
HVI: Hipertrofia ventricular izquierda.
Ig: Inmunoglobulina.
KO: *Knockout*.
LMM: Meromiosina ligera.
MCD: Miocardiopatía dilatada.
MCH: Miocardiopatía hipertrófica familiar.
MS: Muerte súbita.

NHLBI: *National Heart, Lung and Blood Institute of the NIH.*

NIH: *National Institutes of Health.*

NLM: *National Library of Medicine.*

NNS: Splice Site Prediction by Neural Network.

N-terminal: Amino-terminal.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PKA: Proteína fosfoquinasa A.

PKAc: Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

PKC: Proteína quinasa C.

Polyphen: *Polymorphism Phenotyping*

rs: *reference_SNP.*

Rv: *Reverse.*

SAP: *Shrimp alkaline phosphatase.*

SBE: *Single base extension.*

Segmentos PEVK: Secuencia rica en residuos de prolina, glutamina, valina y lisina.

SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant.*

SSCP: *Single strand conformation polymorphisms.*

SSF: *Splicesitefinder.*

SUP: Sistema ubiquitin-proteosoma.

VI: Ventrículo izquierdo.

ÍNDICE

RESUMEN	3
RESUMO	7
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	15
1.- Miocardiopatía hipertrófica	15
2.- El sarcómero: Estructura e importancia en el correcto funcionamiento del corazón	16
2.1.- Estructura básica del citoesqueleto del músculo cardiaco.	
El sarcómero	20
2.1.1.- Proteínas del filamento grueso	22
2.1.1.1.- Miosina	22
2.1.1.2.- Proteína C de unión a la miosina	23
2.1.2.- Proteínas del filamento delgado	23
2.1.2.1.- Actina.....	25
2.1.2.2.- Complejo troponina	25
2.1.2.2.1.- Troponina T	26
2.1.2.2.2.- Troponina I	26
2.1.2.2.3.- Troponina C	27
2.1.2.3.- α -Tropomiosina	27
2.1.3.- Otras proteínas.....	28
2.2.- Función del sarcómero: la contracción muscular	29
2.2.1.- Regulación de la contracción.....	31
2.2.1.1.- Complejo troponina-tropomiosina.....	32
2.2.1.2.- Otros factores reguladores	33
3.- Proteínas C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca	33
3.1.- Estructura	33

3.2.- Funciones de la proteína C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca.....	36
3.2.1.- Función estructural.....	36
3.2.2.- Función reguladora.....	37
4.- Bases genéticas de la MCH.....	39
4.1.- Complejidad desde el punto de vista genético.....	39
4.2.- Penetrancia incompleta, factores ambientales y genes modificadores.....	41
5.- Genes que producen fenocopias.....	41
6.- Mutaciones en el gen <i>MyBPC3</i> y su relación con la MCH familiar.....	42
6.1.- Importancia del gen <i>MyBPC3</i> en el desarrollo de la MCH.....	42
6.2.- Mecanismo de acción de las mutaciones en el gen <i>MyBPC3</i>	43
6.2.1.- La teoría del péptido venenoso.....	43
6.2.2.- Haploinsuficiencia.....	44
6.2.3.- Alteraciones en la fosforilación.....	44
6.3.- Aspectos clínicos de las mutaciones en <i>MyBPC3</i>	44
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1.- Cohorte.....	53
2.- Análisis genéticos.....	53
2.1.- Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico.....	53
2.2.- <i>Screening</i> del gen <i>MyBPC3</i> por SSCP.....	53
2.2.1.- Amplificación de los exones del gen <i>MyBPC3</i>	

mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
2.2.1.1.- Diseño de los <i>primers</i>	54
2.2.1.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
2.2.2.- Análisis de la conformación de las cadenas sencillas de ADN.....	57
2.2.2.1.- Condiciones de optimización de las SSCP	58
2.2.3.- Secuenciación.....	59
2.2.3.1.- Estudio de sensibilidad	59
2.2.3.2.- Secuenciación de fragmentos con movilidad anormal	60
2.2.3.3.- Confirmación de las variantes no sinónimas por secuenciación.....	60
2.3.- <i>Screening</i> de mutaciones conocidas por plataforma de genotipado SEQUENOM.....	60
2.3.1.- Estrategia de desarrollo de la plataforma de genotipado SEQUENOM	61
2.3.1.1.- Identificación de secuencias de referencia y de mutaciones conocidas	61
2.3.1.2.- Inclusión de las mutaciones identificadas en el laboratorio	62
2.3.2.- Ensayo iPLEX® GOLD de Sequenom	62
2.3.2.1.- Preparación placa de ADN	63
2.3.2.2.- Preparación de las mezclas de los <i>primers</i>	63
2.3.2.3.- Amplificación del ADN mediante PCR	63
2.3.2.4.- Tratamiento con SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)	64
2.3.2.5.- Extensión de una única base (SBE, <i>single base extension</i>).....	64
2.3.2.6.- Dilución y tratamiento con resina.....	65
2.3.2.7.- Transferencia de los productos de extensión al SpectroCHIP Bioarray	65
2.3.2.8.- Análisis de los fragmentos de extensión y genotipado.....	65
2.3.2.9.- Confirmación de los resultados por secuenciación.....	66

3.- Datos clínicos de los casos índices	66
4.- Estudio bioinformático: análisis de secuencias.....	66
4.1.- Conservación de aminoácidos	66
4.2.- Análisis informático de mutaciones con cambio de sentido	67
4.2.1.- Propiedades físico-químicas de los aminoácidos	67
4.2.2.- Impacto potencial de la sustitución de un aminoácido por otro	67
4.2.2.1.- Poliphen	68
4.2.2.2.- PMut	68
4.2.2.3.- SIFT	69
4.2.3.- Predicción de la estructura secundaria: Implicaciones en la estructura de láminas beta y hélices alfa: GOR V.....	69
4.3.- Análisis informático de mutaciones que causan un cambio de pauta en la lectura de del ácido ribonucleico mensajero (ARNm)	69
4.4.- Análisis informático de mutaciones que afectan al <i>splicing</i> : Identificadores de sitios aceptores y donadores de <i>splicing</i>	70
5.- Estudios familiares	70
RESULTADOS	73
1.- Análisis genéticos.....	73
1.1.- <i>Screening</i> del gen <i>MyBPC3</i> por SSCP y secuenciación de fragmentos con movilidad anormal	73
1.1.1.- Sensibilidad de las condiciones de optimización de la SSCP.....	77
1.2.- <i>Screening</i> de mutaciones conocidas por plataforma de genotipado SEQUENOM	78
1.2.1.- Relación de mutaciones que se testan por la plataforma de genotipado	78

1.2.2.- Relación de mutaciones que no se testan por la plataforma de genotipado	90
1.2.3.- Sensibilidad de la plataforma	91
1.2.4.- Evaluación de la presencia de mutaciones conocidas en otros genes sarcoméricos (<i>TNNT2</i> , <i>TNNI3</i> , <i>TNNC1</i> , <i>TPMI</i> , <i>ACTC</i> , <i>TTN</i> , <i>MYL2</i> , <i>MYL3</i> , <i>MYH6</i> , <i>TCAP</i> , <i>MYO6</i> y <i>MYLK2</i>)	92
2.- Análisis clínicos de la cohorte.....	93
3.- Estudios bioinformáticos	95
3.1.- Conservación y alineamientos entre especies de las mutaciones y sus regiones flanqueantes	95
3.2.- Alineamientos entre isoformas de proteínas C de unión a a la miosina.....	96
3.3.- Comparación de la conservación de aminoácidos de la c-MyBPC entre especies e isoformas	98
3.4.- Análisis informático de mutaciones con cambio de sentido	99
3.4.1.- Propiedades físico-químicas de los aminoácidos implicados en las mutaciones de cambio de sentido.....	99
3.4.1.1.- Mutaciones <i>missense</i> sobre aminoácidos polares	100
3.4.1.2.- Mutaciones <i>missense</i> sobre aminoácidos no polares	101
3.4.2.- Impacto potencial de la sustitución de un aminoácido por otro.....	102
3.4.3.- Predicción de estructura secundaria (servidor GOR V).....	104
3.5.- Análisis informático de mutaciones que causan un cambio en la pauta de lectura de ARNm. Predicción de los efectos de las deleciones a nivel de transcripción y traducción.....	104
3.6.- Análisis informático de mutaciones que afectan al <i>splicing</i> : las secuencias donadoras yceptoras de <i>splicing</i>	105

4.- Estudios familiares	106
4.1.- Familias con mutaciones <i>missense</i>	107
4.1.1.- Familia H73: Mutación D75N.....	107
4.1.2.- Familia H42: Mutación A216T	108
4.1.3.- Familia H161: Mutación R495W	110
4.1.4.- Familias H147 y H614. Mutación R502Q.....	110
4.1.5.- Familia H120: Mutación T957S	110
4.1.6.- Familias H153, H166 y H641: Mutación E542Q.....	114
4.1.7.- Familias H18 y H49: Mutación R1022P	116
4.1.8.- Familia H279: Mutación V471E	117
4.1.9.- Familia H95: Mutación E1179K	119
4.2.- Mutaciones que causan truncamiento	120
4.2.1.- Familia H13: Mutación Q327fs.....	120
4.2.2.- Familia H37: Mutación K600fs.....	122
4.2.3.- Familia H160: Mutación P955fs	123
4.2.4.- Familia H56: Mutación IVS6+5G>A.....	125
4.2.5.- Familia H110: Mutación IVS11-9G>A.....	126
4.2.6.- Familia H131: Mutación IVS29+5G>A.....	127
4.3.- Estudios familiares de las mutaciones <i>in frame</i>	129
4.3.1.- Familia H46: Mutación K504del.....	129
DISCUSIÓN.....	133
1.- Análisis genéticos.....	133
1.1.- Frecuencia de mutaciones en el gen <i>MyBPC3</i>	133
1.2.- Tipos de mutaciones en el gen <i>MyBPC3</i>	135
1.3.- Localización de las mutaciones en el gen <i>MyBPC3</i>	136
1.3.1.- Localización por dominios de las mutaciones <i>missense</i>	137
1.3.2.- Localización de las mutaciones que provocan señales prematargas de terminación.....	138
1.3.2.1.- Deleciones que provocan un cambio en la pauta de lectura de los aminoácidos	139

1.3.2.2.- Cambios en los intrones que afectan a secuencias donadoras o aceptoras de <i>splicing</i>	140
1.3.3.- Mutaciones que modifican el número de aminoácidos de la proteína sin desencadenar cambio de pauta en la lectura	140
1.4.- Frecuencia y tipos de polimorfismos en el gen <i>MyBPC3</i>	140
1.5.- Plataforma de genotipado Iplex (SEQUENOM).....	144
2.- Análisis clínicos de la cohorte.....	145
3.- Estrategias para establecer las relaciones genotipo-fenotipo: Abordaje interdisciplinar. Patogenicidad de las mutaciones identificadas.....	146
3.1.- Patogenicidad de las mutaciones de cambio de sentido.....	147
3.1.1.- Mutaciones identificadas sobre aminoácidos polares ácidos (D75, E542 y E1179).....	147
3.1.1.1.- Patogenicidad de la mutación D75N	148
3.1.1.2.- Patogenicidad de la mutación E542Q.....	149
3.1.1.3.- Patogenicidad de la mutación E1179K.....	151
3.1.2.- Mutaciones en aminoácidos polares básicos (R495, R502, R1002)	152
3.1.2.1.- Patogenicidad de la mutación R495W.....	153
3.1.2.2.- Patogenicidad de la mutación R502Q	154
3.1.2.3.- Patogenicidad de la mutación R1022P	155
3.1.3.- Mutaciones en aminoácidos polares no cargados (T957).....	156
3.1.4.- Mutaciones en aminoácidos no polares (A216 y V471).....	157
3.1.4.1.- Patogenicidad de la mutación A216T.....	157
3.1.4.2.- Patogenicidad de la mutación V471E.....	158
3.1.5.- Conclusiones del análisis de las mutaciones <i>missense</i>	159
3.2.- Patogenicidad de las mutaciones que provocan codones prematuros de <i>stop</i>	161
3.2.1.- Patogenicidad de las mutaciones <i>frameshift</i>	162
3.2.1.1.- Patogenicidad de la mutación Q327fs	162
3.2.1.2.- Patogenicidad de la mutación K600fs	164

3.2.1.3.- Patogenicidad de la mutación P955fs	166
3.2.2.- Patogenicidad de las mutaciones identificadas en secuencias donadoras o aceptoras de <i>splicing</i>	167
3.2.2.1.- Patogenicidad de la mutación IVS6+5G>A	167
3.2.2.2.- Patogenicidad de la mutación IVS11-9G>A	169
3.2.2.3.- Patogenicidad de la mutación IVS29+5G>A	171
3.2.3.- Conclusiones del análisis de las mutaciones que provocan codones prematuros de <i>stop</i>	172
3.3.- Patogenicidad de la mutación <i>in frame</i> K504del	173
3.4.- Mutaciones en el gen <i>MyBPC3</i> y fenotipos severos de MCH	174
3.4.1.- Influencia de genotipos complejos sobre el fenotipo	175
4.- Importancia del <i>screening</i> de mutaciones y de los estudios familiares desde el punto de vista clínico	176
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	187
DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	215

RESUMEN

Introducción y Objetivos

Las mutaciones en el gen *MyBPC3* están entre las causas más frecuentes de miocardiopatía hipertrófica, de todas formas su prevalencia varía entre las distintas poblaciones. Estas mutaciones se han asociado, en muchas ocasiones, con manifestación temprana de la enfermedad.

Los principales objetivos de esta Tesis Doctoral fueron:
Establecer la prevalencia de mutaciones en el gen *MyBPC3* y determinar las características clínicas asociadas en nuestros pacientes.

Métodos

Screening por polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) y secuenciación de los fragmentos con movilidad anormal del gen *MyBPC3* en 130 casos índice no emparentado y con MCH.

Además, *screening* de mutaciones conocidas en genes causantes de MCH, utilizando la plataforma Sequenom MassArray™ (Sequenom Inc.).

Por último, estudios de correlación genotipo-fenotipo en las familias positivas.

Resultados

Se encontraron 16 mutaciones en 20 casos índice (15%): 5 nuevas [D75N, V471E, Q327fs, IVS6+5G>A (en homocigosis), and IVS11-9G>A] y 11 descritas previamente [A216T, R495W, R502Q (2 familias), E542Q (3 familias), T957S, R1022P (2 familias), E1179K, K504del, K600fs, P955fs y IVS29+5G>A]. El grosor máximo de la pared del ventrículo y la edad del diagnóstico fue similar en pacientes con mutaciones en *MYH7* y *MyBPC3* [25(7) vs. 27(8), $p=0.16$], [46(16) vs. 44(19), $p=0.9$].

Conclusiones

Las mutaciones en *MyBPC3* están presentes en el 15% de nuestras familias con MCH. La expresión severa y temprana de la hipertrofia es compatible con la presencia de mutaciones en el gen *MyBPC3*. El diagnóstico genético no solo permite evitar el

seguimiento clínico de los no portadores sino que abre nuevas posibilidades que incluyen: tomar decisiones clínicas preventivas en portadores de mutación que no han desarrollado todavía la enfermedad, el establecimiento de relaciones genotipo-fenotipo, y establecer una rutina de diagnóstico genético en pacientes con MCH familiar.

RESUMO

Introdución e Obxectivos

As mutacións no xene *MyBPC3* están entre as causas máis frecuentes de miocardiopatía hipertrófica, de todas formas a su prevalencia varía entre as distintas poboacións. Estas mutacións asociáanse, en moitas ocasións, con manifestación precoz da enfermidade.

Os principais obxectivos desta Tese Doutoral foron:

Establecer a prevalencia de mutacións no xene *MyBPC3* e determinar as características clínicas asociadas nos nosos doentes.

Métodos

Screening a través de polimorfismo de conformación de cadea sinxela (SSCP) e secuenciación dos fragmentos con movibilidade anormal do xene *MyBPC3* en 130 casos índice non emparentados e con MCH.

Ademáis, *screening* de mutacións conocidas en xenos causantes de MCH, coa plataforma Sequenom MassArrayTM (Sequenom Inc.).

Por último, estudos de correlación xenotipo-fenotipo nas familias positivas.

Resultados

Atopáronse 16 mutacións en 20 casos índice (15%): 5 novas [D75N, V471E, Q327fs, IVS6+5G>A (en homocigosis), e IVS11-9G>A] e 11 descritas previamente [A216T, R495W, R502Q (2 familias), E542Q (3 familias), T957S, R1022P (2 familias), E1179K, K504del, K600fs, P955fs y IVS29+5G>A]. O grosor máximo da parede do ventrículo e a idade do diagnóstico foi similar en doentes con mutacións en *MYH7* y *MyBPC3* [25(7) vs. 27(8), $p=0.16$], [46(16) vs. 44(19), $p=0.9$].

Conclusiones

As mutacións en *MyBPC3* están presentes no 15% das nosas familias con MCH. A expresión severa e precoz da hipertrofia é compatible coa presenza de mutacións no xene *MyBPC3*. O diagnóstico xenético non só permite evitar o seguimento clínico dos

non portadores senón que abre novas posibilidades que inclúen: tomar decisións clínicas preventivas en portadores da mutación que non teñan desenrolado aínda a enfermidade, o establecemento de relacións xenotipo-fenotipo, y establecer unha rutina de diagnóstico xenético en doentes con MCH familiar.

ABSTRACT

Introduction and Objectives

MyBPC3 mutations are amongst the most frequent causes of hypertrophic cardiomyopathy, however, its prevalence varies between populations. They have been associated with mild and late onset disease expression. Our objectives were to establish the prevalence of *MyBPC3* mutations and determine their associated clinical characteristics in our patients.

Methods

Screening by Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCP) and sequencing of the fragments with abnormal motility of the *MyBPC3* gene in 130 unrelated consecutive HCM index cases.

Moreover, screening of known mutations in HCM disease genes using Sequenom MassArray™ system (Sequenom Inc.).

Finally, genotype-phenotype correlation studies were done in positive families.

Results

16 mutations were found in 20 index cases (15%): 5 novel [D75N, V471E, Q327fs, IVS6+5G>A (homozygous), and IVS11-9G>A] and 11 previously described [A216T, R495W, R502Q (2 families), E542Q (3 families), T957S, R1022P (2 families), E1179K, K504del, K600fs, P955fs and IVS29+5G>A]. Maximum wall thickness and age at time of diagnosis were similar to patients with *MYH7* mutations [25(7) vs. 27(8), $p=0.16$], [46(16) vs. 44(19), $p=0.9$].

Conclusions

Mutations in *MyBPC3* are present in 15% of our hypertrophic cardiomyopathy families. Severe hypertrophy and early expression are compatible with the presence of *MyBPC3* mutations. The genetic diagnosis not only allows avoiding clinical follow up of non carriers but it opens new possibilities that includes: to take preventive clinical decisions in mutation carriers than have not developed the disease yet, the establishment of

genotype-phenotype relationship, and to establish a genetic diagnosis routine in patients with familial HCM.

INTRODUCCIÓN

1.- Miocardiopatía hipertrófica

La miocardiopatía hipertrófica familiar (MCH) es una enfermedad autosómica dominante que se manifiesta con hipertrofia ventricular izquierda (HVI) en ausencia de otras enfermedades cardiovasculares y pérdida de la correcta organización de los miocitos. Tiene una prevalencia de 1 en 500 (Maron y cols., 1995) y es la primera causa de muerte súbita (MS) en menores de 35 años y en deportistas. Sin embargo, la MCH incluye a pacientes asintomáticos sin diagnóstico previo o señales de HVI (Maron y cols., 2003; Elliott y McKenna, 2004).

La MCH afecta a ambos sexos, presentándose en pacientes de razas diferentes y en múltiples áreas geográficas (Elliott y McKenna, 2004). La penetrancia es generalmente alta, pero depende de la edad del paciente y del gen en el que se encuentre la mutación (Richard y cols., 2006). Generalmente, se desarrolla durante la adolescencia aunque sus manifestaciones clínicas pueden aparecer después de la década de los 50 (Maron y cols., 2004). Las personas mayores representan el 25% de los casos, de los que el 40-50% tienen formas obstructivas de MCH. Se puede presentar, ocasionalmente, en neonatos y en niños. Asociándose con insuficiencia cardíaca y altos niveles de mortalidad, en el caso concreto de bebés (Maron, 2002).

El concepto de MCH ha ido variando, desde su descripción anatomopatológica en 1957, en función de los progresos en los métodos de diagnóstico. Se ha pasado de definir la MCH como una hipertrofia septal asimétrica que produce obstrucción dinámica en el tracto de salida del ventrículo izquierdo (VI) (exploración física, hemodinámica, ecocardiografía (ECO) modo M) a descubrir que la distribución de la hipertrofia puede ser muy variable (septal, concéntrica, apical, entre otros) con o sin obstrucción (ECO modo B y Doppler).

La gran heterogeneidad molecular, patológica y clínica de la MCH complica su diagnóstico. El diagnóstico clínico se basa, sobre todo, en la detección de HVI mediante la ecocardiografía bidimensional o resonancia magnética (Maron y cols., 2006; Maron y cols., 2003; Elliott y McKenna, 2004). Pero en el caso de formas atípicas, con HVI suave, localizada o no detectable, es difícil encontrar individuos afectados mediante estos métodos. Entre un 20-30% de los pacientes adultos afectados genéticamente se detectan con dificultad por medio de la ECO debido a que la MCH tiene penetrancia incompleta (Richard y cols., 2006; McKenna y cols., 1997; Hagège y cols., 1998). Estos

individuos pueden mostrar predisposición prematura a MS o desarrollar el fenotipo más tarde a lo largo de la vida (Varnava y cols., 2001; Maron y cols., 2001).

La susceptibilidad a complicaciones como la MS, y la progresión a situaciones como la insuficiencia cardíaca, han motivado a los investigadores para buscar indicadores capaces de identificar la enfermedad en estadios tempranos.

Desde que en 1990 se describiera la primera mutación, en el gen que codifica la cadena pesada de la β -miosina (*MYH7*), como causa de MCH (Geisterfer-Lowrance y cols., 1990), se han identificado mutaciones en 11 genes que codifican proteínas contráctiles y componentes del sarcómero, de ahí que se haya definido como una enfermedad sarcomérica (Watkins y cols., 1995; Richard y cols., 2006; Maron y cols., 2006).

Se han identificado más de 600 mutaciones en genes que codifican para proteínas sarcoméricas (Richard y cols., 2006; Ashrafian y Watkins, 2007; <http://www.cardiogenomics.org>). Las mutaciones en los genes *MYH7* y *MyBPC3* (gen que codifica para la proteína C cardíaca de unión a miosina) son las que aparecen con mayor frecuencia ya que, representan entre el 60-80% de los casos donde se encuentra mutación (Richard y cols., 2006). En particular, en el gen *MyBPC3* se han descrito más de 150 mutaciones que son responsables del 15 al 20% de los casos de MCH familiar (Niimura y cols., 1998; Erdmann y cols., 2001; Van Driest y cols., 2005), lo que representa el 43% de los pacientes genotipados (Richard y cols., 2003).

2.- El sarcómero: Estructura e importancia en el correcto funcionamiento del corazón

A continuación y para entender el contexto molecular donde se desarrolla la MCH, vamos a exponer de forma breve los elementos fundamentales del mecanismo contráctil cardíaco.

El músculo cardíaco está formado por células musculares ramificadas, los miocitos, que poseen uno o dos núcleos y que constituyen la unidad celular de dicho músculo (Barany y Barary, 2002).

Los miocitos, tienen el núcleo ubicado en el centro del citoplasma y presentan estriaciones transversales, similares a las del músculo esquelético. El retículo sarcoplásmico no está muy desarrollado y se distribuye irregularmente entre las

miofibrillas, que no aparecen claramente separadas. Las células están rodeadas por una lámina externa, comparable a la lámina basal de los epitelios. El 70% del volumen celular del miocito está ocupado por miofibrillas y mitocondrias. Las mitocondrias están distribuidas regularmente y son las encargadas de aportar la energía para que la contracción pueda llevarse a cabo (Barany y Barary, 2002) (Figura 1).

Los miocitos son unidades independientes pero conectadas entre sí, a través de áreas especializadas de la membrana celular interdigitalizada, los discos intercalares, (Figura 1), para formar las fibras del miocardio (Ganong, 2004).

Los discos intercalares se encuentran en regiones de la membrana donde los extremos de dos células se enfrentan y se ubican en lugar de un disco Z. Presentan una porción transversa, en la que se ubican dos tipos de uniones intercelulares: las uniones adherentes (*fascia adherens*) y los desmosomas (*mácula adherens*) (Fatkin y Graham, 2002). Estas estructuras mantienen la comunicación entre las células del músculo cardiaco, facilitando que, tanto el impulso eléctrico como la contracción discurren en una dirección.

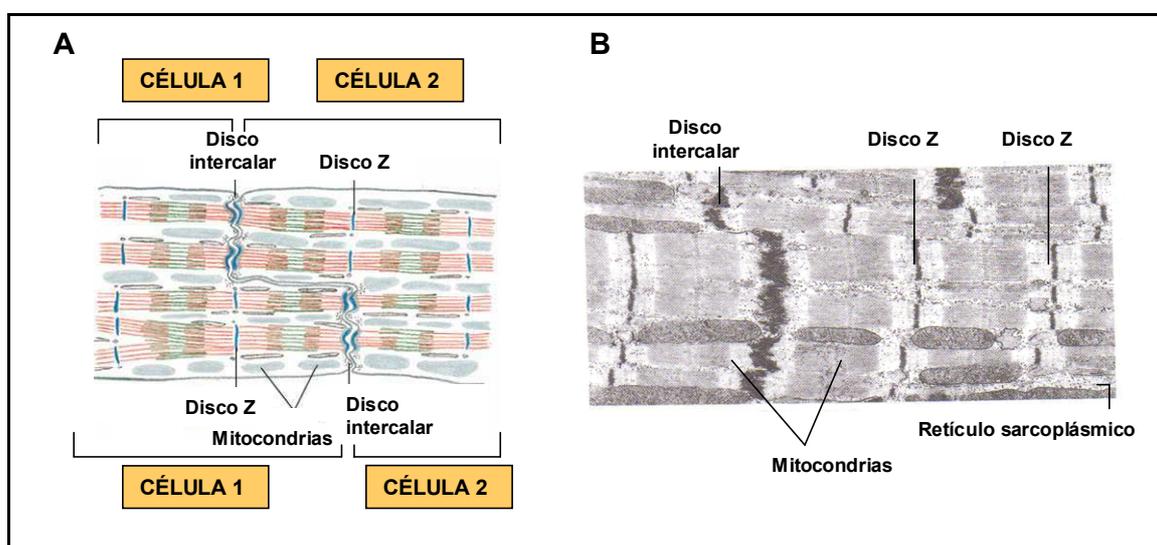


Figura 1: Discos intercalares. En la imagen A se muestran de forma esquemática, mientras que la imagen B corresponde a un barrido con el microscopio electrónico a 2 Å (Alberts y cols., 2004).

Las uniones adherentes son propias del corazón y contienen N-cadherina, cateninas y vinculina. Estas estructuras anclan los filamentos de actina a la membrana plasmática y unen las membranas de células adyacentes, de esta manera se asocian el aparato contráctil de cada célula con el de la célula vecina.

Los desmosomas se sitúan en las porciones transversas y paralelas del disco y contienen, entre otras, las siguientes proteínas: desmoplaquina, placoglobina,

desmocolina y desmogleína (Figura 2). Los desmosomas anclan los filamentos intermedios de la fibra cardíaca y participan junto con la *fascia adherens*, en la adhesión de las membranas plasmáticas de células vecinas (Holthöfer y cols., 2007).

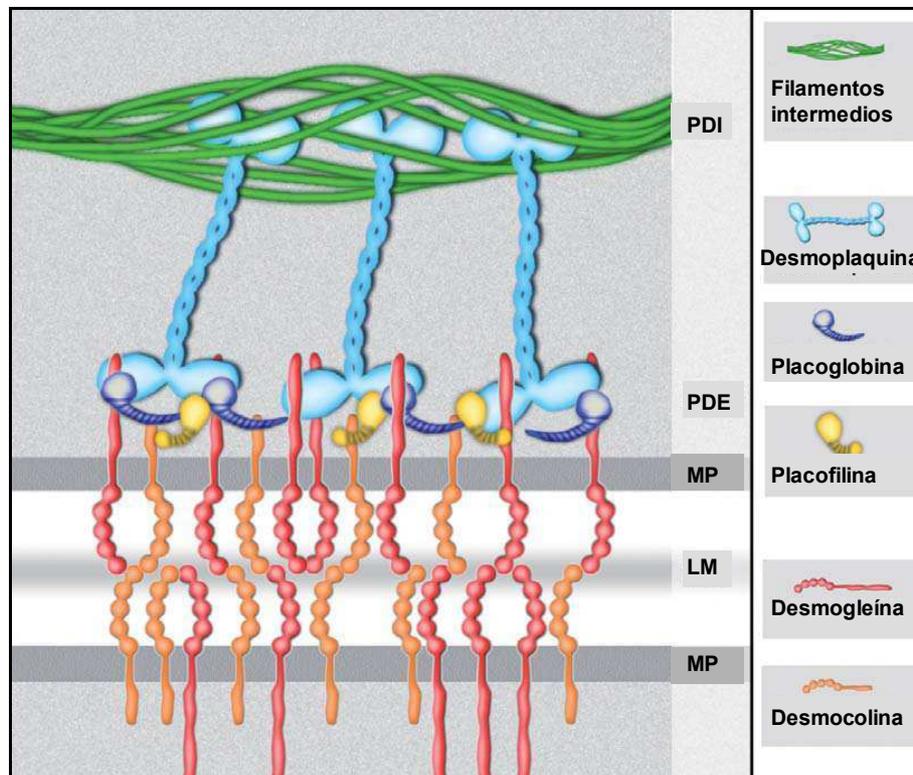


Figura 2: Esquema representativo de los principales componentes del desmosoma. MP: membrana plasmática, LM: línea media PDE: exterior de la placa desmosomal. PDI: interior de la placa desmosomal (Holthöfer y cols., 2007).

Las uniones de comunicación (*gap junctions*) corresponden a sitios que permiten el paso de iones y moléculas pequeñas desde el citoplasma de una célula a la célula vecina y son ricas en conexina (Fatkin y Graham, 2002) .

Las miofibrillas del músculo cardíaco son, estructuralmente, iguales a las del músculo esquelético. Los túbulos T del músculo cardíaco son de mayor diámetro que los del músculo esquelético y se ubican a nivel del disco Z. Los túbulos se asocian generalmente con una sola expansión de las cisternas del retículo sarcoplásmico. La característica del músculo cardíaco son las diadas, compuestas de un túbulo T y de una cisterna del retículo sarcoplásmico.

A diferencia del músculo esquelético, las fibras musculares cardíacas están constituidas por un conjunto de células cardíacas unidas entre sí en disposición lineal, que se bifurcan y recombinan para formar una compleja red tridimensional (Figura 3). Esta estructura de las fibras, además de la conexión entre las células mediante discos

intercalares, determina que el corazón se comporte como un sincitio funcional (Fatkin y Graham, 2002; Ganong, 2004).

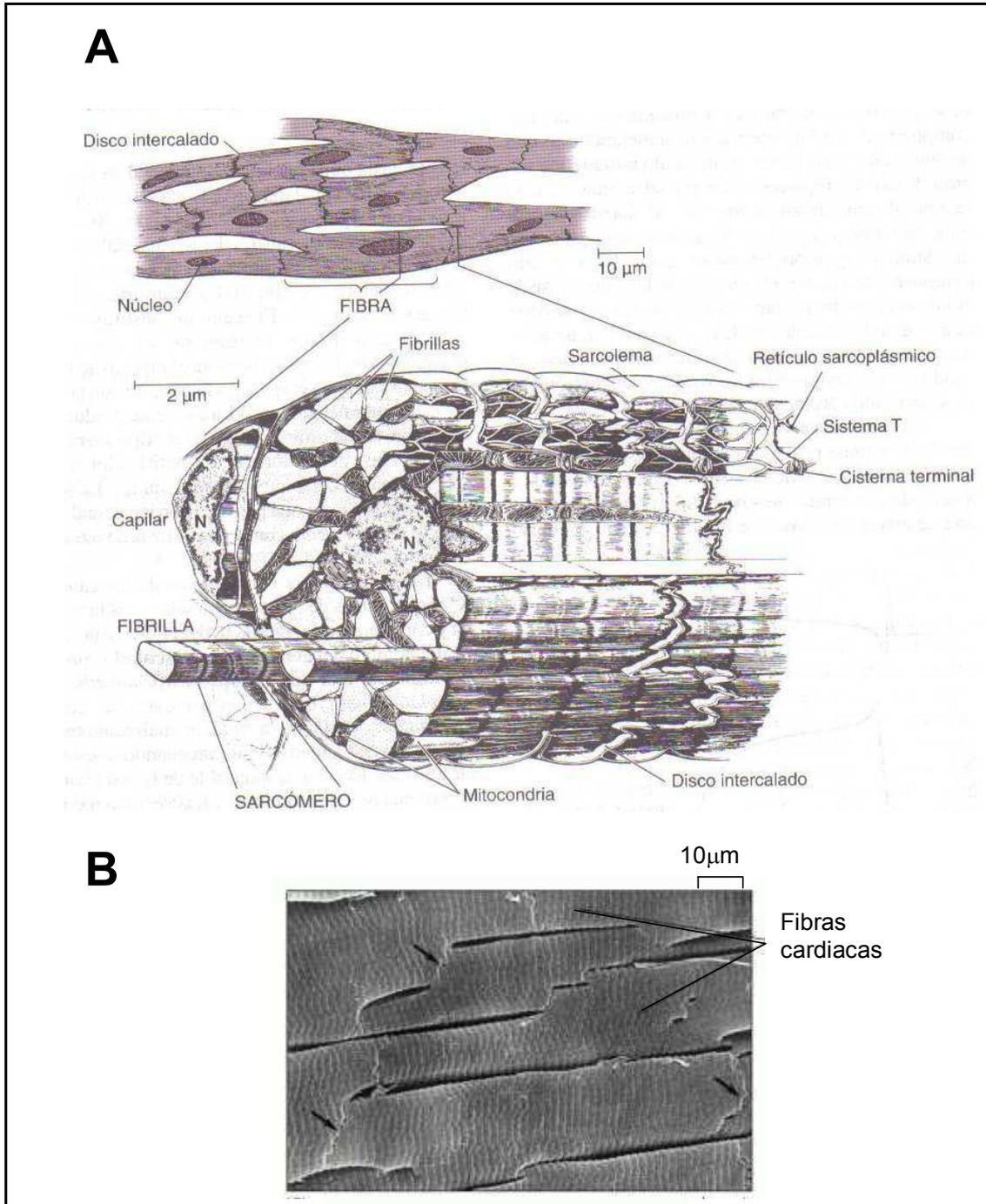


Figura 3: Fibras cardiacas. A) Dibujo esquemático de los cardiomiocitos y de la organización de sus elementos celulares (Ganong, 2004). B) Micrografía electrónica que muestra músculo cardiaco de una rata. Las flechas señalan a los discos intercalares (Alberts y cols., 2004).

2.1.- Estructura básica del citoesqueleto del músculo cardiaco. El sarcómero

Los haces de miofibrillas se ordenan de forma longitudinal ocupando la mayor parte del citoplasma de las fibras cardiacas (Figura 3A). Estos haces son responsables del carácter estriado del tejido, observable incluso a simple vista pero con mayor precisión, a nivel microscópico, utilizando luz polarizada.

La visión con el microscopio de luz polarizada permite ver, en las miofibrillas, los patrones de bandas oscuras y claras (Figura 4A). A lo largo de las mismas, se repiten de manera intercalada, bandas anisotrópicas, birrefringentes que desvían la luz polarizada (bandas A) y bandas isotrópicas carentes de birrefringencia y atravesadas con mayor facilidad por la luz polarizada (bandas I). Las bandas I están interrumpidas por unas líneas oscuras denominadas líneas Z (de *zwischen Scheibe*= disco intermedio). En el centro de la banda A aparece una banda más clara, la banda H (de *hell*= claro) en cuyo centro aparece una línea más oscura, la línea M (de *mittellmembran*= membrana media).

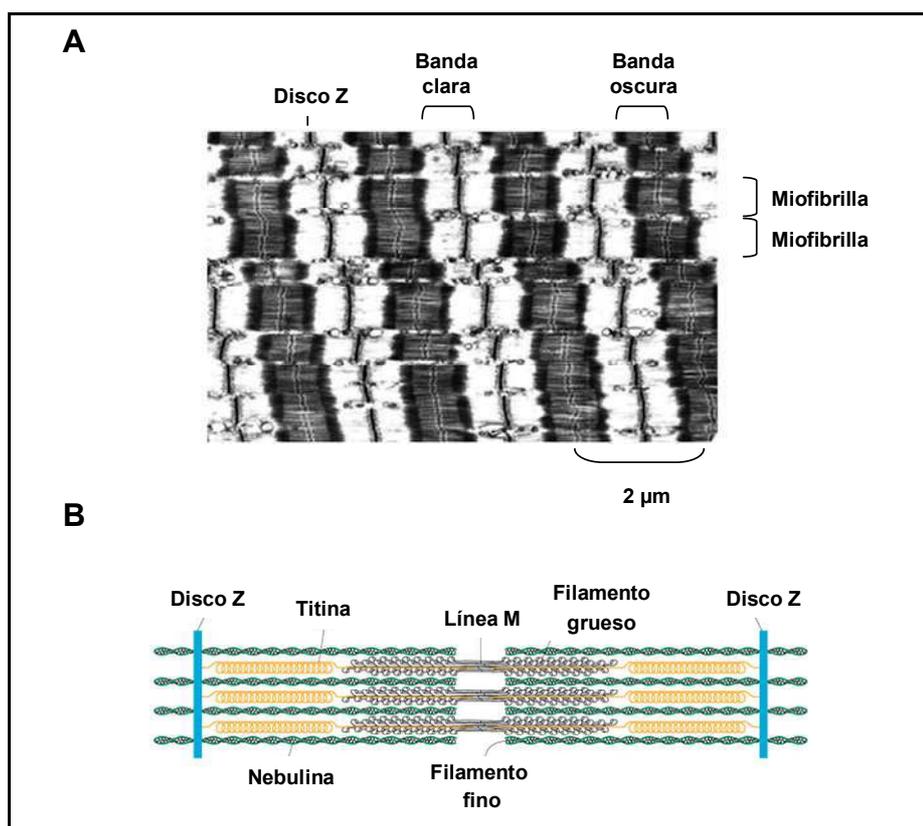


Figura 4: Estructura del sarcómero del miocito. A) Visión del sarcómero al microscopio electrónico. B) Esquema del sarcómero (Alberts y cols., 2004).

Este patrón de bandas permite identificar la unidad de repetición de las miofibrillas, el sarcómero, como la región que se extiende de una línea Z a la siguiente.

Por tanto, abarca una banda A (con su banda H y línea M centrales) y dos semibandas I a sus lados (Alberts y cols., 2004).

A nivel ultraestructural, la banda A se corresponde con la presencia de abundantes filamentos gruesos (12-16 nm de diámetro), mientras que las semibandas I se corresponden con la presencia de los filamentos finos (8 nm de diámetro) que se anclan a las bandas Z de los extremos del sarcómero. Estos filamentos aparecen intercalados en una zona de solapamiento en los extremos de la banda A formando una malla regular con simetría hexagonal. De hecho, vemos como la banda H corresponde con la zona de la banda A donde sólo se encuentra la parte central de los filamentos gruesos. Si descendemos aún más en la descripción molecular de estas estructuras, vemos que los filamentos gruesos están compuestos por un conjunto de colas de moléculas de miosina y los filamentos finos están compuestos por moléculas globulares de actina ensambladas en forma de un doble collar helicoidal de cuentas (Figura 4B).

Por tanto, el sarcómero se compone de una serie de proteínas que se clasifican en función de su localización como proteínas del filamento grueso y proteínas del filamento delgado (Figuras 5 y 6).

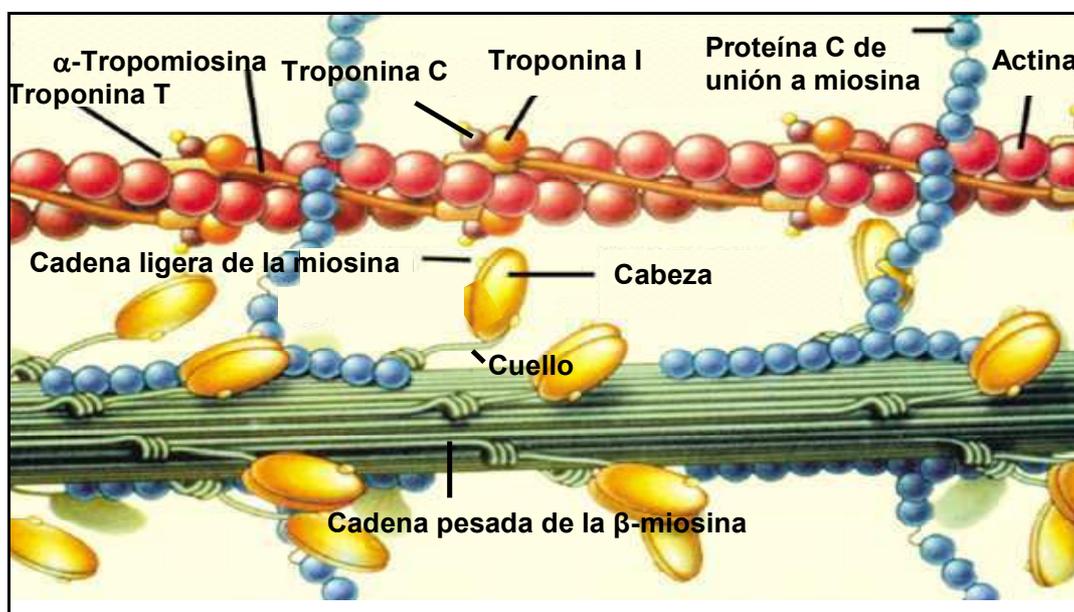


Figura 5: Proteínas contráctiles del sarcómero cardíaco: en este dibujo se aprecian las interacciones entre las distintas proteínas que forman el sarcómero. Dichas interacciones determinan la forma de los filamentos gruesos y de los filamentos finos (Spirito y cols., 1997).

2.1.1.- Proteínas del filamento grueso

2.1.1.1.- Miosina

La miosina es una proteína hexámerica y asimétrica, formada por dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras.

La cadena pesada de la miosina es una proteína de 1935 aminoácidos que está codificada por el gen *MYH7*, consta de 40 exones y se encuentra en el *locus* 14q12 (Jaenicke y cols., 1990; Liew y cols., 1990; Wendel y cols., 2000).

Cada cadena pesada de la miosina está formada por una cola con forma de hélice α súperenrollada y una cabeza globular que es la parte enzimática de la proteína. Los extremos carboxi-terminales (C-terminales) de las dos cadenas pesadas se combinan formando una estructura helico-helicoidal (*coiled-coil*), con aminoácidos distribuidos estratégicamente para facilitar su integración en el eje del filamento grueso. El extremo amino-terminal (N-terminal) de cada una de las cadenas pesadas forma una estructura globular donde reside la capacidad de hidrolizar el adenosín trifosfato (ATP). En el segmento intermedio de unión de la cabeza con la cola se ensamblan las cadenas ligeras de la miosina.

La cadena ligera reguladora de la miosina (CLR) pertenece a una superfamilia de proteínas de unión al Ca^{2+} y se caracteriza por tener motivos estructurales de unión al Ca^{2+} , manos EF (Trybus y Lowey, 1988). La CLR estabiliza el cuello α helicoidal de la cabeza de la miosina, e interviene en la regulación de la actividad adenosín trifosfatasa (ATPasa) (Fatkin y Graham, 2002). La isoforma que se expresa en el ventrículo y en el músculo esquelético es una proteína de 166 aminoácidos codificada por el gen *MYL2* (Trybus y Lowey, 1988). Este gen consta de siete exones y su localización citogenética es 12q23-q24.3 (Macera y cols., 1992).

La cadena ligera esencial de la miosina (CLE) tiene una masa de 27 kDa, y su función es la de mantener la estructura de la cabeza globular de la miosina (VanBuren y cols., 1994). Se expresa en el ventrículo y en el músculo esquelético de contracción lenta. Es una proteína de 195 aminoácidos codificada por el gen *MYL3*, que consta de siete exones y su localización citogenética es 3p21 (Fodor y cols., 1989).

La cola de la miosina es la parte que se polimeriza y se une con otras miosinas, para formar la estructura del filamento grueso y la cabeza globular es donde se produce la hidrólisis de ATP que genera el impulso de la contracción y donde se produce la

unión con la actina del filamento delgado (Lehninger y cols., 1995; Mathews y cols., 2001). Las cadenas ligeras son iguales dos a dos e intervienen en la unión de la cabeza de la miosina con la actina (Figura 6A).

Cada filamento grueso está constituido por unas trescientas moléculas de miosina formadas, cada una de ellas, por seis cadenas (dos pesadas, dos ligeras reguladoras y dos ligeras esenciales). Estos cientos de moléculas de miosina se agregan mediante un empaquetamiento helicoidal bipolar.

La organización de las moléculas de miosina para formar el filamento grueso da una parte central desnuda en la que no aparecen cabezas, sugiriendo que en las líneas M existe una interacción cola con cola de las miosinas simétricas. Mientras que, los dos extremos del filamento grueso muestran una serie de protuberancias regulares, las cabezas de las miosinas (Figura 6B). En el caso de los músculos de los vertebrados, tres cabezas se sitúan cada 14.3 nm. De forma que, las cabezas vuelven a encontrarse, en posiciones equivalentes respecto a la hélice del filamento, cada 3 repeticiones.

2.1.1.2.- Proteína C cardiaca de unión a la miosina

La proteína C cardiaca de unión a la miosina (c-MyBPC) es una proteína de 137 kDa, que se localiza en la región central de la banda A, en la zona C (Gilbert y cols., 1996) y que consta de 1274 aminoácidos (Carrier y cols., 1997). Está implicada en el ensamblaje del sarcómero promoviendo la polimerización del filamento grueso (Offer y cols. 1973; Saad y cols., 1987). Esta proteína está codificada por el gen *MyBPC3*, cuya localización citogenética es 11p11.2 (Gautel y cols., 1995). Su estructura y función se ampliarán en el capítulo 3 de esta introducción.

2.1.2.- Proteínas del filamento delgado

El filamento delgado se ha definido como un complejo dinámico de proteínas que trabajan coordinadas para regular la contracción, mediante una vía calcio dependiente. Está formado, principalmente, por actina cardiaca, α tropomiosina, y el complejo troponina (Tobacman, 1996; Kobayashi y cols., 2008).

En los filamentos delgados, cada molécula de tropomiosina recorre 7 monómeros de actina y tiene un complejo de troponina unido a su superficie.

La actina es la proteína mayoritaria en el filamento delgado, y es la que se une con la miosina del filamento grueso para generar el impulso de la contracción.

La troponina es un complejo de 3 subunidades que se dispone en forma discontinua a lo largo del microfilamento.

La tropomiosina mantiene compacta la estructura del filamento y junto con las distintas troponinas forman el complejo regulador de la contracción (Figura 6C).

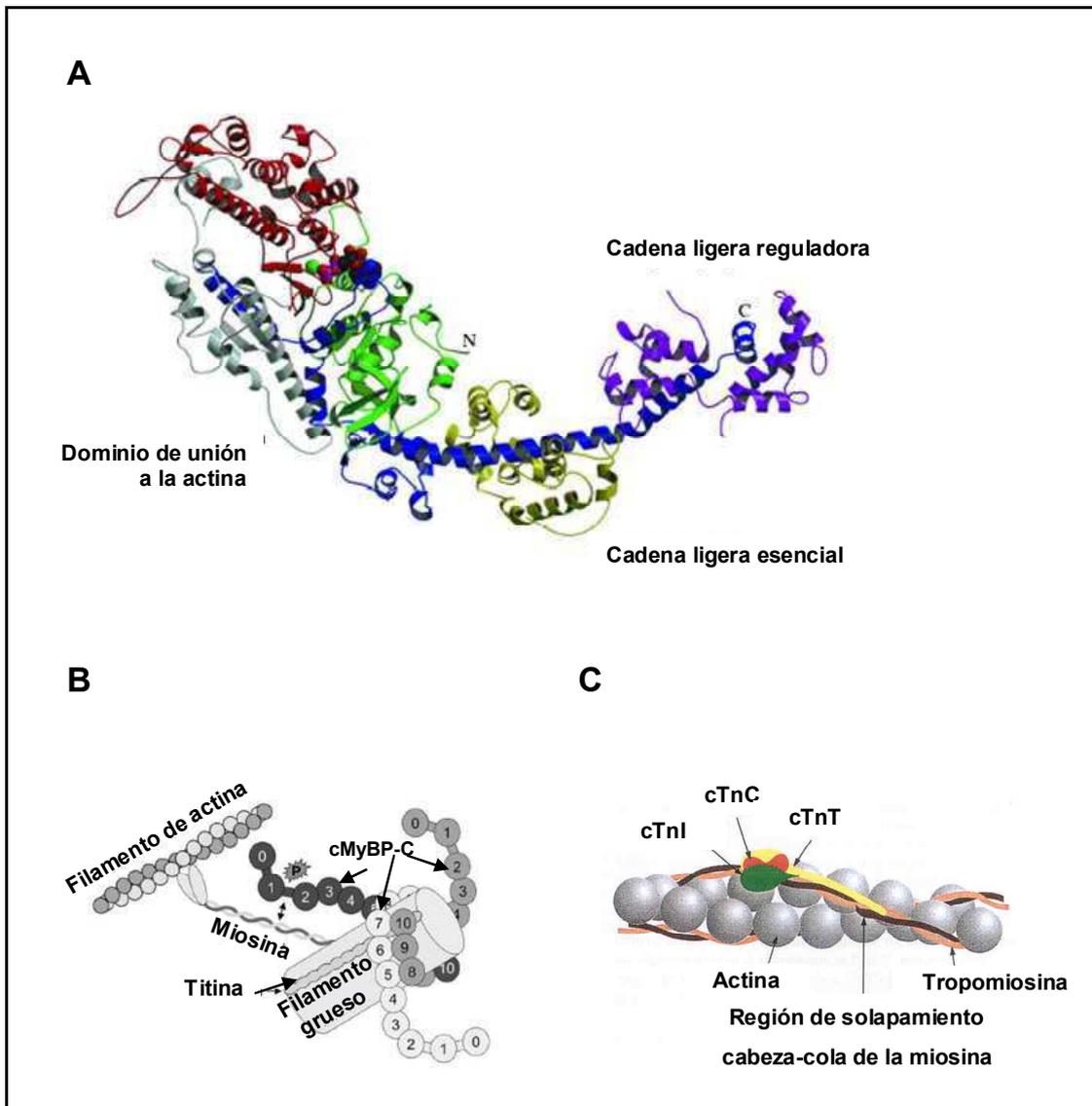


Figura 6: Componentes de los filamentos grueso y delgado. A) Cadena pesada de la miosina unida a la cadena ligera esencial (CLE, amarillo) y a la cadena ligera reguladora (CLR, morado) de la miosina; dominio de unión con el ATP en verde y de unión con la actina en rojo (Holmes y Geeves, 2000). B) Proteína C de unión a la miosina unida al filamento grueso de miosina (Oakley y cols., 2004). C) Complejo troponina (C en rojo, T en amarillo e I en verde) – tropomiosina (naranja) unido al filamento de actina (gris) (Gordon y cols., 2000).

2.1.2.1.- Actina

La actina es una proteína con forma globular (actina G), de 4.5nm de diámetro y cuya masa molecular es de 42kDa. La actina G agrega para formar la actina F o actina fibrosa, que es un polímero lineal de monómeros de actina G. Los microfilamentos de actina están constituidos por 2 hebras uniformes de 8 nm de diámetro, que se enrollan para formar una estructura helicoidal doble. Cada monómero se orienta respecto al siguiente mediante un giro de 166° y un desplazamiento de 2.75nm, lo que le confiere el aspecto de una doble hebra, de manera que las dos hebras se cruzan cada 36-37nm. (Alberts y cols., 2004; Kobayashi y cols., 2008). Por cada vuelta hay 13 a 14 monómeros globulares de actina (Grazi y cols., 2004).

La α -actina es la isoforma predominante en el corazón y está codificada por el gen *ACTC* (*locus* 15q14), constituido por 6 exones que codifican una proteína de 375 aminoácidos (Hamada y cols., 1982).

El dominio N-terminal de la actina cardiaca es el punto donde se forman los puentes transversales con la miosina, mientras que el dominio C-terminal contiene los sitios de unión para la α -actinina y la distrofina.

2.1.2.2.- Complejo troponina

El complejo troponina tiene forma globular y consta de tres subunidades distintas. A cada una de ellas se las ha denominado de acuerdo con su función: la troponina I cardiaca (cTnI) puede inhibir la actividad ATPasa de la actomiosina, independientemente de las otras subunidades; la troponina C cardiaca (cTnC) une Ca^{+2} , eliminando la inhibición de la cTnI; y la troponina T cardiaca (cTnT) se encarga de unir el complejo troponina a la α -tropomiosina.

El dominio globular del complejo troponina forma el núcleo o *core* de dicho complejo. Este está constituido por la cTnC, la cTnI menos los primeros 30 aminoácidos del extremo N-terminal, y los aminoácidos 183-288 de la cTnT (Takeda y cols., 2003).

La estructura por difracción de rayos X del núcleo del complejo mostró que el complejo troponina está dominado por α -hélices, que se pueden dividir en subdominios y *linkers* flexibles que son estructuralmente distintos. Destacan dos de estos

subdominios. El primero es una cabeza reguladora que consiste en los aminoácidos 3-84 de la cTnC y los aminoácidos 150-159 de la cTnI. El segundo es un brazo IT, que consiste en los residuos 93-161 de la cTnC, aminoácidos 42-136 de la cTnI y aminoácidos 203-271 de la cTnT (Takeda y cols., 2003; Kobayashi y cols., 2008).

2.1.2.2.1.- Troponina T

La isoforma de troponina T que se expresa en el corazón adulto está codificada por el gen *TNNT2*, localizado en la posición 1q32 (Mesnard y cols., 1995). La cTnT tiene 288 aminoácidos, distribuidos en dos dominios claramente diferenciados, dominio N-terminal y dominio C-terminal. La Tn T se une a la Tm en la región de solapamiento cabeza-cola de los heterodímeros, interaccionando con ella tanto por su dominio N-terminal como por el C-terminal (Figura 7). Así mismo, la TnT interacciona, por su dominio globular C-terminal, con la TnI y la TnC (Takeda y cols., 2003).

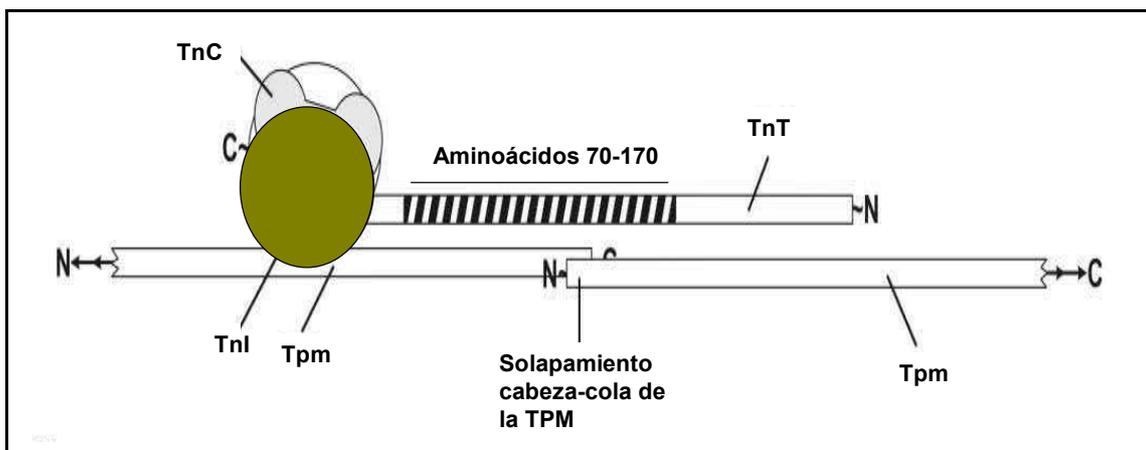


Figura 7: Esquema del complejo troponina-tropomiosina (Palm y cols., 2001).

2.1.2.2.2.- Troponina I

La cTnI es la subunidad inhibitoria del complejo troponina. Esta proteína está constituida por 210 aminoácidos, tiene un peso molecular de 30KDa, y está codificada por el gen *TNNI3* (Vallins y cols., 1990; Bhavsar y cols., 1996), localizado en el *locus* 19q13.4 (Mogensen y cols., 1997).

La región inhibitoria de la cTnI es un motivo de 20 aminoácidos (residuos 128-147) que está altamente conservado y que se une tanto a la actina-tropomiosina como a

la cTnC, dependiendo de la concentración intracelular de calcio (Lindhout y cols., 2002).

Además, la isoforma cardíaca tiene características únicas que la diferencian de la isoforma esquelética. Ya que, consta de una extensión de 33 aminoácidos en su extremo N-terminal. Presenta sitios de fosforilación que, tampoco, están presentes en músculo esquelético. De manera que, las serinas 22 y 23 son sustratos para la PKA y las serinas 41 y 43 y la treonina 142 lo son para la proteína quinasa C (PKC) (Bhavsar y cols., 1996; Lindhout y cols., 2002).

2.1.2.2.3.- Troponina C

La cTnC es una proteína de 161 aminoácidos que está codificada por el gen *TNNC1*, localizado en el *locus* 3q21-14 (Schreier y cols., 1990; Bermingham y cols., 1995).

Esta proteína consta de dos dominios globulares (N y C- terminales) que están conectados a través de un *linker* flexible. Cada dominio globular tiene un par de motivos implicados en la unión a Ca^{2+} , del tipo mano EF (hélice-bucle-hélice).

El dominio C-terminal es el dominio estructural y el dominio N-terminal es el dominio regulador de la proteína. La unión de Ca^{2+} , en el sitio específico II del dominio regulador, fortalece la interacción TnC-TnI, provocando la liberación de la TnI-actina.

El complejo troponina-tropomiosina, entonces, se mueve más profundamente en el surco de la actina, de esta manera quedan libres los sitios de unión a miosina de la actina haciéndolos disponibles para la contracción (Takeda y cols., 2003; Landstrom y cols., 2008).

2.1.2.3.- α -Tropomiosina

La α -tropomiosina es una proteína que se expresa en el miocardio ventricular y en el músculo esquelético estriado. Es una molécula rígida, con forma de varilla y 41 nm de longitud.

La cadena polipeptídica consta de 284 aminoácidos y está codificada por el gen *TPMI* (MacLeod y Gooding, 1988), localizado en el *locus* 15q22.1 (Eyre y cols., 1995). Estas cadenas adoptan una estructura secundaria en α -hélice que gira hacia la derecha, y

se estabiliza mediante puentes de hidrógeno entre los grupos CO y NH de péptidos cercanos. Hay aproximadamente unos 3.7 aminoácidos por cada vuelta completa de la hélice.

En ambiente acuoso, la α -hélice aislada no suele ser estable, por lo que dos α -hélices cercanas se enroscan una sobre la otra, para formar filamentos que corren a lo largo de ambos bordes del microfilamento de actina (McLachlan y cols., 1975).

Su principal función es modular la interacción entre la actina y la miosina (Stewart, 2001).

2.1.3.- Otras proteínas

El esqueleto sarcomérico está compuesto de proteína M, titina y miomesina (Figura X), y sirve de andamio a los filamentos gruesos y delgados. Las tres proteínas forman la línea M y están formando una red que envuelve al resto de las bandas sarcoméricas (Obermann y cols., 1996).

La titina es una proteína gigante y flexible que se extiende desde la línea Z hasta la línea M. Esta proteína tiene una masa de 3000 kDa, y supone el 10% del músculo estriado esquelético (Fatkin y Graham, 2002). Abarca medio sarcómero, con una porción extensible dentro de la banda I y una porción rígida dentro de la banda A.

El 90% de la masa de la titina se compone de 298 repeticiones de dominios de inmunoglobulinas (Ig) y fibronectina (Fn) tipo 3 (Maruyama, 1997). La región de las bandas I contiene dominios de Ig, con secuencias ricas en residuos de prolina, glutamina, valina y lisina (segmentos PEVK) y una región específica cardíaca N2B (Houmeida y cols., 1995).

La titina contribuye al ensamblaje y a la organización del sarcómero puesto que, es el elemento elástico que une el filamento grueso con la línea Z (Maruyama, 1997; Ganong, 2004). Además, estos filamentos elásticos podrían transmitir la fuerza activa hacia los discos Z, fuerza que de otra manera no podría alcanzar nunca los extremos del sarcómero.

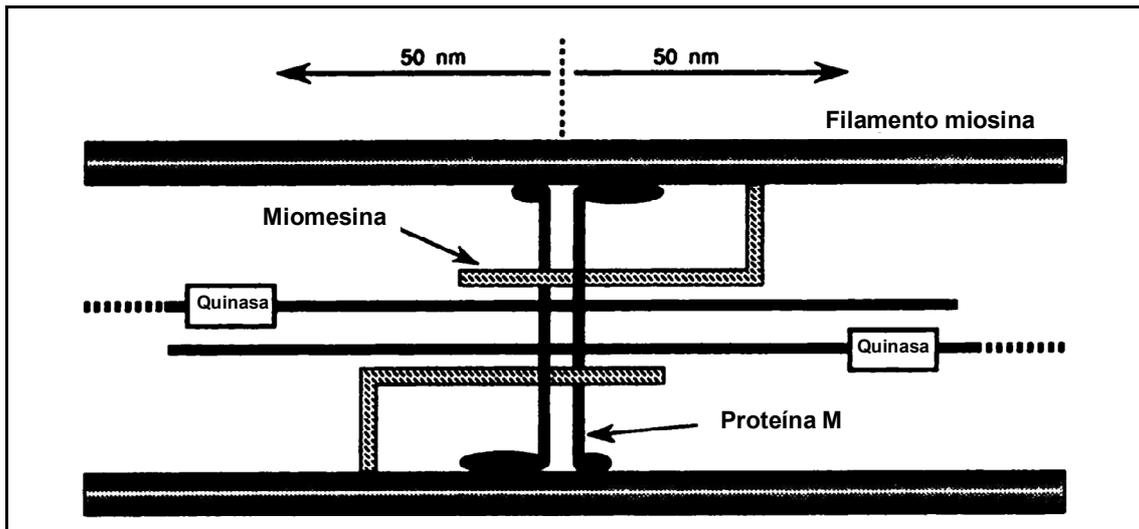


Figura 8: Esquema de los componentes extracelulares de un cardiomicito (Maruyama, 1997).

La proteína M y la miosesina 1 tienen una estructura similar, formada por un único dominio N-terminal de 138 residuos seguido de doce dominios repetidos que reflejan los dominios Ig C2 y Fn 3 (Vinkemeier y cols., 1993).

La proteína M y la miosesina 1 se unen tanto a la titina como a la miosina (Obermann y cols., 1998). La miosesina podría actuar estableciendo puentes paralelos entre la parte final de la titina, localizada en la banda M, con los filamentos gruesos de miosina (Obermann y cols., 1997). Mientras que, la proteína M establece puentes perpendiculares entre la titina y los filamentos gruesos (Obermann y cols., 1996) (Figura 8).

2.2.- Función del sarcómero: la contracción muscular

La teoría que explica la contracción muscular se denomina “modelo de los filamentos deslizantes” (Huxley y Niedergerke, 1954; Huxley y Hanson, 1954) (Figura 9). En este modelo, el motor molecular es la miosina que, en presencia de actina, convierte la energía química en energía mecánica (Huxley, 1957a; Huxley, 1957b; Holmes y Geeves, 2000).

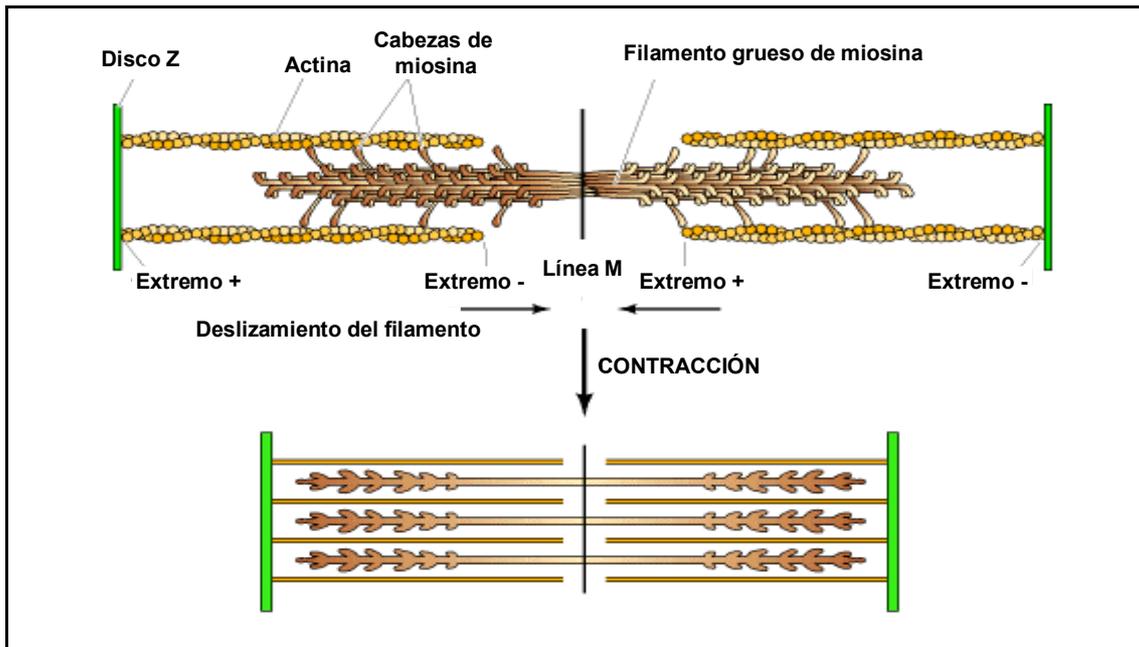


Figura 9: Los filamentos gruesos están formados por la asociación de varios cientos de moléculas de miosina. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina formando puentes entre los filamentos de miosina y de actina (*cross-bridges*). En este esquema se muestra la contracción del sarcómero, mediante el deslizamiento de los filamentos delgados de actina sobre los filamentos gruesos de miosina (Cooper, 2000).

El deslizamiento de los filamentos gruesos sobre los delgados se produce gracias a la unión y liberación cíclica de los puentes cruzados entre la actina y la miosina (Amos y cols. 1982; Holmes y Geeves, 2000). Durante esa interacción, la cabeza de miosina hidroliza ATP a adenosín difosfato (ADP) + Pi, generándose una serie ordenada de cambios alostéricos en su conformación. El proceso es reversible porque la energía de hidrólisis del ATP se almacena en la miosina, que adquiere una conformación altamente comprimida (Alberts y cols., 2004; Mathews y cols., 2001). Cada cabeza de miosina “camina” en una única dirección a lo largo del filamento delgado impulsada por una variación muy favorable de la energía libre. Al sufrir un cambio cíclico de conformación, la cabeza de la miosina va estirando el filamento de actina, provocando que éste se deslice sobre el filamento grueso (Figura 10).

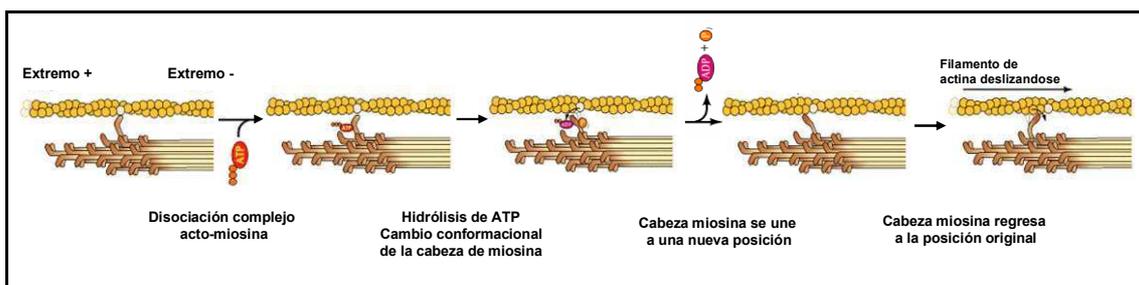


Figura 10: Esquema del movimiento de deslizamiento de los filamentos de actina sobre las de miosina (Cooper, 2000).

Cuando una cabeza de miosina se ha separado del filamento de actina, es arrastrada por la acción de otras cabezas del mismo filamento grueso. Cada filamento grueso tiene unas 5000 cabezas de miosina y, en una contracción rápida, cada una de ellas realiza 5 ciclos por segundo, lo que le confiere una velocidad al deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos de 15 $\mu\text{m/s}$ (Alberts y cols., 2004; Cooper, 2000).

Los cambios estructurales en el dominio catalítico de la cabeza de la miosina son amplificados mediante la rotación de su cola, actuando como una palanca del brazo (Rayment y cols., 1993; Fisher y cols., 1995; Dominguez y cols., 1998; Holmes y Geeves, 2000; Huxley, 2000).

El desplazamiento de la actina depende del número de estados ligados y de la orientación, tanto de la cabeza como de la cola súperenrollada de la miosina. Posiblemente se puede unir tanto una cabeza de miosina a una molécula de actina en dos puntos, como dos o más cabezas de miosina a un único punto de la actina (Mathews y cols., 2001; Fatkin y Graham, 2002).

2.2.1.- Regulación de la contracción

En el miocardio humano sano existe un equilibrio entre fosfatasas y quinasas. Estas enzimas son las encargadas de fosforilar a las proteínas reguladoras, que modulan la contractilidad del cardiomiocito. Este equilibrio se rompe durante la insuficiencia cardiaca (Zipes y cols., 2005) y en la MCH (Maron y cols., 2002).

El desequilibrio entre quinasas y fosfatasas es perjudicial ya que puede dar lugar al remodelado cardiaco y los cambios en la fosforilación de las proteínas reguladoras, que afectan a la función del cardiomiocito.

A nivel del miofilamento, la activación de la PKA, iniciadora de la cascada de kinasas de los receptores β -adrenérgicos, fosforila la troponina I, c-MyBPC y la titina, proteínas que todas ejercen efectos diferenciales sobre la función del miofilamento. De hecho, una disminución en la fosforilación de las proteínas diana de la PKA altera la función del miofilamento (Hamdani y cols., 2008).

Aunque es el complejo troponina-tropomiosina el que ejerce, fundamentalmente, la regulación de la contracción del músculo, existen otras proteínas reguladoras, como ya hemos mencionado anteriormente.

2.2.1.1.- Complejo troponina-tropomiosina

El complejo troponina-tropomiosina es un interruptor sensible al Ca^{2+} que regula la interacción entre la actina y la miosina (Mathews y cols., 2001; Barany y Barary, 2002).

Los dímeros de tropomiosina se colocan orientados, de la cabeza a la cola, sobre los surcos de las hélices de actina, abarcando siete monómeros (Figura 11) (Mathews y cols., 2001; Barany y Barary, 2002).

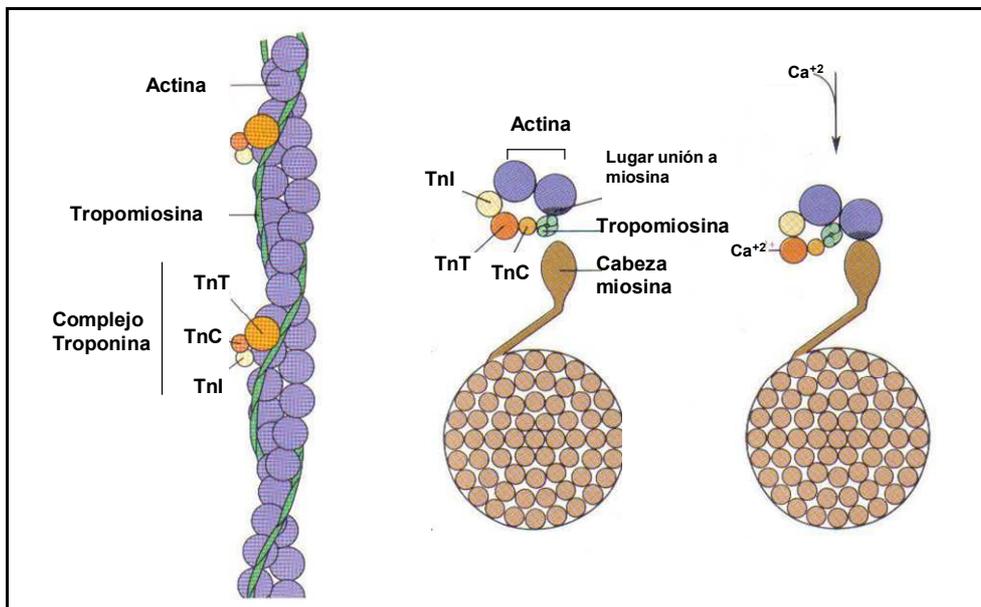


Figura 11: Asociación de la tropomiosina y de las troponinas con los filamentos de actina. A) La tropomiosina se extiende a lo largo de los filamentos de actina y está asociada con un complejo de tres troponinas (TnT=Troponina T, TnC=Troponina C, TnI=Troponina I). B) Sección transversal de filamento fino y grueso. En ausencia de Ca^{2+} , el complejo tropomiosina-troponina bloquea la unión de las cabezas de miosina a la actina. La unión de Ca^{2+} a la troponina C provoca un cambio conformacional del complejo y permite que se pueda llevar a cabo (Mathews y cols., 2001).

El complejo troponina está anclado a la tropomiosina principalmente por la TnT, y en menor grado por la TnI, mientras que la TnC interactúa con las TnT y TnI. Durante la diástole, la interacción actina-miosina está inhibida por la unión entre la troponina I con el complejo actina-tropomiosina. Mientras que, durante la sístole, el tránsito de Ca^{2+} intracelular aumenta favoreciéndose su unión a la cTnC y facilitando un movimiento de la región inhibitoria de la cTnI desde el filamento delgado a la cTnC (Lindhout y cols., 2002; Ganong, 2004). Estos cambios liberan al filamento fino de su estado inhibido, promoviendo la interacción actina-miosina y la generación de fuerza. Una reducción de

la concentración de Ca^{2+} intracelular causa la disociación de la cTnC y restablece el estado relajado (Solaro y Van Eyk, 1996) (Figura 11).

El efecto de la fosforilación de la cTnI es, principalmente, una modulación de la contractilidad cardíaca, mediante la disminución de la actividad ATPasa acto-miosina, que es mediada por la PKC, o mediante el aumento de la unión de la cTnI al filamento delgado, mediado por PKA (Bhavsar y cols., 1996; Lindhout y cols., 2002).

2.2.1.2.- Otros factores reguladores

Las CLE y CLR se unen a la α hélice de la palanca del brazo del puente cruzado de la miosina, modulando la cinética de los puentes cruzados (Sanbe y cols., 2000).

La proteína C de unión a miosina (MyBP-C) participa en la regulación adrenérgica de la contracción cardíaca (Kunst y cols., 2000). La fosforilación de esta proteína acelera la cinética de los puentes cruzados en el miocardio. Una regulación defectuosa lleva a disfunción cardíaca (Hamdani y cols., 2008; Tong y cols., 2008). La función reguladora de esta proteína será tratada con más detalle posteriormente (apartado 3 de la introducción).

3.- Proteínas C de unión a la miosina. Isoforma cardíaca

3.1.- Estructura

La MyBP-C se purificó y caracterizó en 1973 por Offer y cols. (1973). Está localizada sobre los filamentos gruesos en bandas discretas separadas entre sí por 43 nm. El número exacto de tiras depende del tipo de músculo (Squire y cols., 2003; Moolman-Smook y cols., 2002; Luther y cols., 2008). Cada tira está compuesta por 2-4 moléculas de MyBP-C y representa cerca del 2% de la masa de la proteína en la miofibrilla (Oakley y cols., 2007).

Las proteínas C pertenecen, como otras proteínas de unión a la miosina y la titina, a la superfamilia de Ig intracelulares y están compuestas por dominios repetidos de Ig y Fn. Son dominios muy conservados en todas estas proteínas, y en particular los dominios C-terminales. Existen tres isoformas de proteína C de unión a miosina, codificadas por tres genes distintos (*MyBPC1*, *MyBPC2* y *MyBPC3*). Los dos primeros

codifican para MyBP-C de músculo esquelético y el tercero para la c-MyBPC (Flashman y cols., 2004; Yamamoto y cols., 1983; Yuan y cols., 2006) (Figura 12).

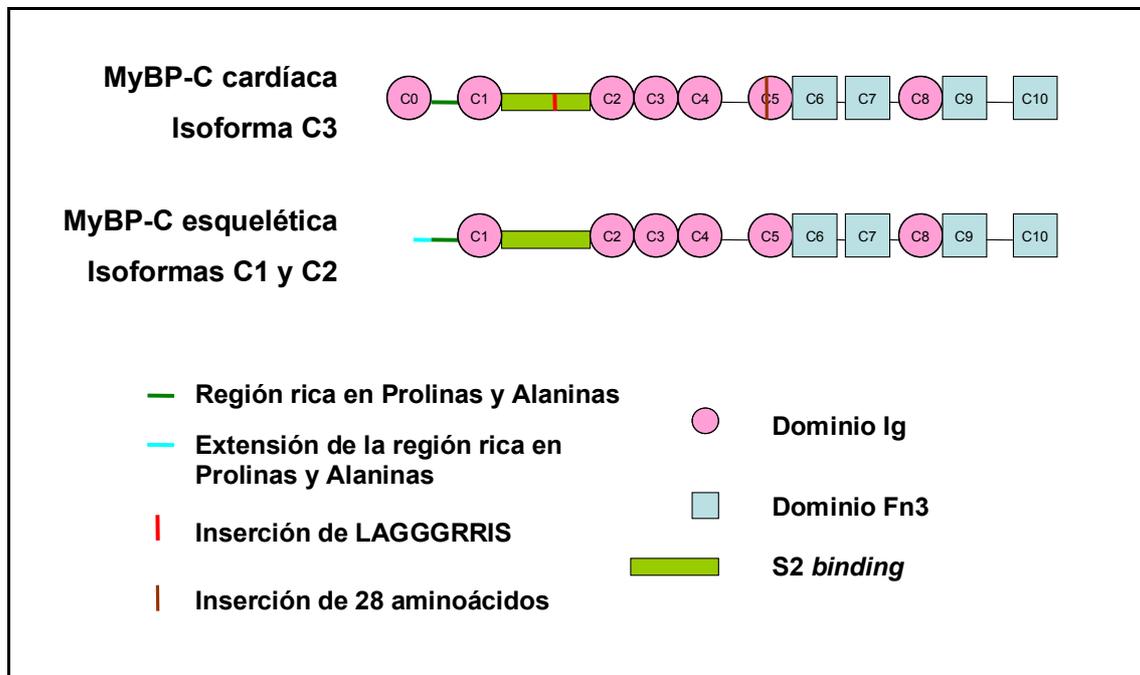


Figura 12: Representación esquemática de la organización en dominios de las tres isoformas de proteína C de unión a miosina. Las MyBP-C consisten en dominios repetidos de tipo Ig y Fn3. La isoforma cardíaca tiene un dominio adicional N-terminal (C0), tres sitios específicos de fosforilación en S2 binding y una inserción rica en residuos prolina/alanina en el dominio C5.

La c-MyBPC consta de 1274 aminoácidos y tiene 10 dominios globulares (C1-C10), el motivo *S2-binding* y la región rica en prolina/alanina antes del dominio C1 que también tienen las otras isoformas. Pero, además, consta de un dominio Ig adicional en el extremo N-terminal (denominado C0), una secuencia de aminoácidos (LAGGRRIS) dentro del motivo *S2-binding*, y una inserción de 28 aminoácidos en el dominio C5 (Flashman y cols., 2004; Winegrad, 1999, Luther y cols., 2008) (Figura 12).

Estos dominios permiten a la c-MyBPC interactuar con otras proteínas sarcoméricas. Se han descrito interacciones con la miosina, la titina y la actina.

Existen evidencias de que la c-MyBPC se une a la actina en alguna parte de la región N-terminal C0-C2 (Oakley y cols., 2007). Según Kulikovskaya y cols. (2003) la interacción con la actina se produce en el dominio C0. Mientras que, para Squire y cols. (2003), el dominio implicado en esta interacción podría ser la región rica en prolina y alanina que hay en el linker entre C0 y C1.

Además, existe una centena de aminoácidos altamente conservados, en esta región N-terminal (C1-C2) que se unen a los 126 residuos proximales del segmento S2

de la miosina, cerca de la región bisagra (Gautel y cols., 1995; Gruen y cols., 1999). Este segmento de la miosina S2 es idéntico en todas las isoformas de miosina de vertebrados, y su interacción con cualquiera de las 3 isoformas de MyBP-C podría modular la movilidad cabeza-cola de la miosina (Gruen y cols., 1999).

Los dominios C-terminales de la c-MyBPC, están implicados en interacciones con la meromiosina ligera (LMM) y con la titina, que permiten estabilizar la estructura del sarcómero. Los dominios C7-C10 tienen una alta afinidad por la LMM, y en concreto el dominio C10 se une a cuatro aminoácidos de la LMM que están cargados positivamente (Oakley y cols., 2007). Y los dominios C8-C10 interactúan con la titina (Watkins y cols., 1995).

La c-MyBPC es una fosfoproteína, sin embargo el número de sitios fosforilados en el tejido cardíaco humano no se conoce con exactitud (Flashman y cols., 2004). A pesar de que no hay medidas del nivel de fosforilación de la c-MyBPC en músculo cardíaco intacto en la literatura (Jacques y cols., 2008a), hay varios trabajos en los que se publica la cantidad de fosfato que se puede incorporar cuando se utilizan quinasas exógenas. Además de las tres serinas localizadas en el *linker* cardioespecífico entre C1–C2 (S273, S282 y S302) (Gautel y cols., 1995), algunos estudios han obtenido medidas de fosforilación de hasta 4 mol Pi/mol (Hartzell y cols., 1984; Schlender y cols., 1991) y en otros, se han identificado 5 aminoácidos diferentes que pueden ser fosforilados *in vitro* o *in vivo* (Yuan y cols., 2006; Jacques y cols., 2008).

Se han postulado varios modelos que intentan explicar cómo se une la c-MyBPC al filamento grueso. Moolman-Smook y cols., (2002) proponen un modelo que consiste en una disposición de collar trimérico (Figura 13A). Los dominios C5-C10 de tres moléculas de c-MyBPC rodean al filamento grueso formando un collar. De manera que el dominio C5 de una molécula interactúa con el C8 de otra, C6 con C9 y C7 con C10. Los dominios C0-C4 se extienden por el espacio interfilamentoso e interactúan, al menos, con la región S2 de la miosina (Moolman-Smook y cols., 2002). Por su parte Squire y cols. (2003) proponen un modelo alternativo en el que no se producen interacciones entre las moléculas de MyBP-C (Figura 13B). Los motivos C7-C10 de una molécula se disponen axialmente a lo largo del esqueleto del filamento grueso y son capaces de interactuar con la titina. El extremo N-terminal queda fuera de la interacción miosina/actina (Squire y cols., 2003).

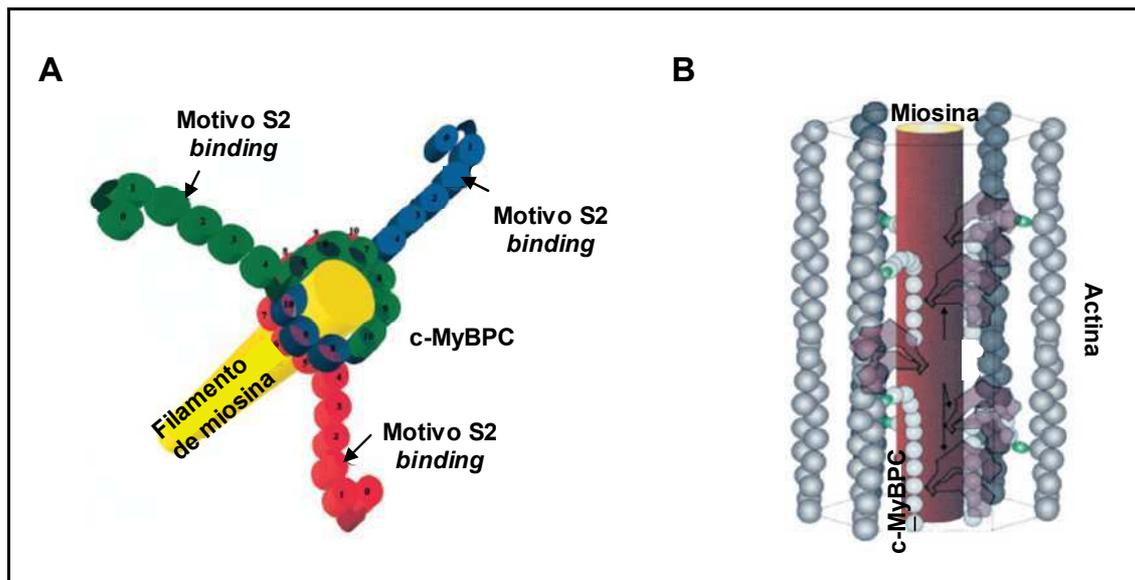


Figura 13: Dos modelos distintos proponen la disposición de la c-MyBPC en el filamento grueso. **A:** Modelo de collar trimérico propuesto por Moolman-Smook y cols. (2002). **B:** Modelo propuesto por Squire y cols. (2003). Las moléculas de c-MyBPC se disponen paralelamente a las colas. Los extremos N-terminales se extienden hacia la cabeza de las miosinas.

3.2.- Funciones de la proteína C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca

El hecho de que la c-MyBPC sea una proteína modular hace que sus funciones se puedan separar dentro de fragmentos definidos que desempeñan funciones estructurales y regulatorias (Sadayappan y cols., 2006).

Aunque en un primer momento se consideró que la MyBP-C era una proteína estructural, parece que juega un papel importante en la modulación de la contractilidad. Los resultados obtenidos con ratones *knockout* (KO) para la c-MyBPC avalan esta idea. Estos ratones desarrollan MCH, pérdida de sensibilidad al Ca^{2+} longitud dependiente, relajación incompleta y aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} del músculo cardiaco (Cazorla y cols., 2006; Pohlmann y cols., 2007; Harris y cols., 2002; Carrier y cols., 2004).

3.2.1.- Función estructural

La c-MyBPC juega un papel importante en la formación del filamento grueso y/o en su estabilidad, facilitando, de esta manera, la transmisión de la fuerza entre los puentes cruzados acto-miosina y la línea M (Freiburg y Gautel, 1996; Gilbert y cols., 1996; Moolman-Smook y cols., 2002; Palmer y cols., 2004a; Nyland y cols., 2009).

El extremo C-terminal de la proteína refuerza el filamento grueso mediante la unión a la LMM de la cola de la miosina, a la titina, y a otras MyBP-C. (Moos y cols., 1975; Starr y cols., 1978; Okagaki y cols., 1993; Freiburg y Gautel, 1996; Gilbert y cols., 1996; Seiler y cols., 1996; Moolman-Smook y cols., 2002; Welikson y cols., 2002).

El extremo N-terminal de la c-MyCBPC interacciona con la región más flexible de la súper-hélice de la miosina, la región S2. Esta unión contribuye a la resistencia del filamento grueso (Nyland y cols., 2009) y a mantener la correcta disposición de las cabezas de miosina (Kulikovskaya y cols., 2003; Cazorla y cols., 2006).

Los análisis de los patrones de difracción de rayos X indican que esta proteína puede proporcionar la unión mecánica entre los filamentos grueso y fino, además de consolidar la estructura del miofilamento (Squire y cols., 2003). Por tanto la c-MyBPC contribuye significativamente a la integridad estructural y a las propiedades mecánicas del sarcómero y del VI (Palmer y cols., 2004b).

3.2.2.- Función reguladora

La fosforilación de la c-MyBPC es esencial para el normal funcionamiento del corazón, aunque se necesitan más estudios para conocer en profundidad su papel. Existen evidencias de que está implicada en la regulación de la función miocárdica. Se ha descrito que niveles adecuados de proteína fosforilada le confieren propiedades cardioprotectoras. De hecho, dicha fosforilación disminuye en la insuficiencia cardiaca y en el daño isquémico (Sadayapan y cols., 2005; Sadayapan y cols., 2006; El-Armouche y cols., 2007). Jacques y cols. (2008a), realizaron medidas cuantitativas de la fosforilación total de la c-MyBPC y obtuvieron reducciones de un 60% en muestras de músculo ventricular humano, procedentes de corazones con insuficiencia cardiaca o con MCH obstructiva. Estos resultados coinciden con los obtenidos al estudiar la fosforilación de otras proteínas contráctiles, en donde la fosforilación de la CLR y de la troponina I se reduce, incluso un 40%, y un 85%, respectivamente (Messer y cols., 2007; Gallon y cols., 2007; Van der Velden y cols., 2003; Jacques y cols., 2006a). Se ha sugerido que el responsable de este descenso sea el aumento de la actividad fosfatasa endógena.

La c-MyBPC es la única proteína del filamento grueso que es fosforilada diferencialmente en múltiples sitios por la proteína fosfoquinasa A (PKA), PKC, y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (Gautel y cols., 1995; Sadayappan y cols., 2006; Oakley y cols., 2007).

El motivo de fosforilación de la proteína se encuentra en el extremo N-terminal de la misma y parece ser crítico para que se produzcan las interacciones miosina-actina y el acoplamiento de los filamentos gruesos con los finos. Funciones que se necesitan para el mantenimiento de la organización del filamento grueso (Sadayappan y cols., 2006) y en definitiva, para la producción de fuerza (Lecarpentier y cols., 2008).

Este motivo, a través de la fosforilación, modula la función contráctil (Kunst y cols., 2000; Gruen y cols., 1999; Harris y cols., 2004; Sadayappan y col., 2006) sin que sea necesario que el extremo C-terminal de la proteína esté anclado en el filamento grueso (Kunst y col., 2000). Por lo que se sugiere que, desempeña un papel importante en la regulación β -adrenérgica de la contracción muscular (Hartzell y cols., 1982; Hartzell y cols., 1984; Garvey y cols., 1988; Schlender y cols., 1991; Gautel y cols., 1995; Jacques y cols., 2008a).

Los resultados de los estudios ultraestructurales muestran que la fosforilación de la MyBP-C alarga las cabezas de la miosina desde la columna del filamento e incrementa su grado de orden y/o altera su orientación, disminuyendo la flexibilidad de los puentes cruzados (Weisberg y Winegrad, 1996; Weisberg y Winegrad 1998; Sadayappan y cols., 2006), y por tanto, aumentando la producción de fuerza (Kunst y col., 2000). Mientras que, cuando la proteína no está fosforilada se une por su extremo N-terminal a la porción del subfragmento-2 de la miosina y reduce la actividad ATPasa de la acto-miosina (Gruen y cols., 1999).

Los estudios realizados en cardiomiocitos aislados de ratones KO para la c-MyBPC, y con distintos grados de hipertrofia vuelven a poner en evidencia que la presencia de c-MyBPC se requiere para la regulación normal de la contractilidad cardiaca. Cazorla y cols. (2006) demostraron que la falta de c-MyBPC:

- Reduce la sensibilidad al Ca^{2+} , dependiente de la longitud del sárcomero,
- y además disminuye significativamente la sensibilidad al Ca^{2+} que produce la PKA.

Estos resultados están en consonancia con la pérdida de relajación que se encuentra en los ratones KO *in vivo* bajo estimulación basal y después de estimulación β -adrenérgica (Carrier y cols., 2004).

4.- Bases genéticas de la MCH

4.1.- Complejidad desde el punto de vista genético

La MCH está causada, mayoritariamente, por mutaciones en alguno de los genes que codifican para las proteínas contráctiles del sarcómero, por lo que se ha definido como una enfermedad sarcomérica (Watkins y cols., 1995; Richard y cols., 2006; Maron y cols., 2006; Ashrafian y Watkins 2007; Kimura, 2008). De hecho, se conocen más de 600 mutaciones en estos genes (Richard y cols., 2006; Ashrafian y Watkins 2007; <http://www.cardiogenomics.org>).

Cuando se testan los principales genes sarcómicos en grandes cohortes con MCH, no emparentadas, se encuentra que aproximadamente el 50-60% de los casos índices tiene al menos, una mutación en alguno de estos genes.

Además, según los resultados de diversos estudios, el 80% de las muestras portadoras de mutación, presentan una mutación en el gen *MYH7* o en el gen *MyBPC3* (Richard y cols., 2003; Van Driest y cols., 2004a,b).

En la Tabla 1 se enumeran genes en los que se han identificado mutaciones responsables de MCH y que codifican proteínas relacionadas con el sarcómero.

Tabla 1: MCH: genes, loci cromosómicos, proteína y tipo de herencia

<i>LOCUS CROMOSÓMICO</i>	<i>GEN</i>	<i>PROTEÍNA QUE CODIFICA</i>	<i>HERENCIA</i>
14q12	<i>MYH7</i>	Cadena pesada de la β -miosina cardiaca	AD
11p11.2	<i>MyBPC3</i>	Isoforma cardiaca de la proteína C de unión a miosina	AD
1q32	<i>TNNT2</i>	Troponina T cardiaca	AD
19q13.4	<i>TNNI3</i>	Troponina I cardiaca	AD
15q22.1	<i>TPM1</i>	α -tropomiosina	AD
12q24.11	<i>MYL2</i>	CLR	AD
3p21.3-p21.2	<i>MYL3</i>	CLE	AD y AR
15q11-q14	<i>ACTC</i>	α -Actina cardiaca	AD
3p21.3-p14.3	<i>TNNC1</i>	Troponina C	AD AD
14q12	<i>MYH6</i>	Cadena pesada de α -miosina cardiaca	
2q31	<i>TTN</i>	Titina	AD AD
11p15.1	<i>CSRP3</i>	Proteína muscular LIM	AD
20q13.31	<i>MYLK2</i>	Quinasa 2 de la cadena ligera de la miosina	AD
1q42-q43	<i>ACTN2</i>	α -Actinina 2	AD
4q26-q27	<i>MYOZ2</i>	Myozenina 2	AD
10q22.3-q23.2	<i>LDB3</i>	Cipher, ZASP	AD
3p25	<i>CAV3</i>	Caveolina-3	AD
17q12	<i>TCAP</i>	Titin-cap, teletonina	AD
10q22.2	<i>VCL</i>	Metavinculina	AD
20q13.12	<i>JPH-2</i>	Junctophilina-2	AD
1q42.13	<i>OBSCN</i>	Obscurina	AD
6q22.1	<i>PLN</i>	Phospholamban	AD
11q22.3-q23.1	<i>CRYAB</i>	Cadena B de α -crystalina	AD

AD: autosómica dominante, AR: autosómica recesiva.

La ausencia de mutaciones en genes sarcoméricos en un porcentaje importante de la población con MCH, ha planteado a los investigadores la búsqueda de mutaciones en otros genes. Recientemente, se ha sugerido que el fenotipo de MCH puede estar relacionado con mutaciones en genes que codifican para proteínas asociadas con el sarcómero (Keren y cols., 2008; Kimura, 2008), aunque estas mutaciones aparecen con

baja frecuencia. Es el caso, por ejemplo, de la quinasa de la cadena ligera de la miosina, la proteína muscular LIM, el dominio 3 de unión a LIM, teletonina, vinculina y metavinculina, α -actinina 2, phospholamban, myozenina 2 y junctophilina 2, entre otras. Además, tampoco se pueden olvidar que existen enfermedades que pueden imitar la expresión de la MCH (ver apartado 5).

4.2.- Penetrancia incompleta, factores ambientales y genes modificadores

La expresión de la enfermedad varía considerablemente, no sólo entre las distintas familias portadoras de una determinada mutación sino también dentro de una misma familia (Erdman y cols., 2001). En ocasiones una misma mutación se ha relacionado en alguna familia con desarrollo tardío de la enfermedad, puesto que la penetrancia era incompleta en individuos jóvenes (Kubo y cols., 2005), mientras que en otras familias la penetrancia era incompleta independientemente del grupo de edad al que perteneciesen (Niimura y cols., 1998). Lo que parece sugerir que la manifestación de la enfermedad parece estar influenciada por factores como: sexo, edad, factores genéticos (mutaciones, polimorfismos, genes modificadores) y factores ambientales (el estilo de vida, el grado de ejercicio físico o la presión sanguínea) (Keren y cols., 2008; Kimura, 2008).

5.- Genes que producen fenocopias

La ausencia de mutaciones en proteínas del sarcómero, en pacientes con un diagnóstico dudoso de MCH, ha llevado a los investigadores a buscar en otros genes la causa de su hipertrofia cardíaca (Gollob y cols., 2001; Blair y cols., 2001; Arad y cols., 2002).

Estos enfermos podrían tener una de las enfermedades que imitan la expresión fenotípica de la MCH (Tabla 2). Estas fenocopias incluyen varios tipos de enfermedades metabólicas como las que afectan al almacenamiento del glucógeno II y III (Amato, 2000), enfermedad Anderson-Fabry (Sachdev y cols., 2002), enfermedades mitocondriales (DiMauro y Schon, 2003), síndromes como los de Noonan y Leopard (Tartaglia y cols., 2002; Sarkozy y cols., 2003), ataxia de Friedreich (Palau, 2001) y otras enfermedades raras (Blair y cols., 2001; Arad y cols., 2002).

Arad y cols. (2005) identificaron mutaciones, en genes relacionados con el metabolismo del glucógeno (*LAMP2* y *PRKAG2*), en el 3.9% de una cohorte que había sido diagnosticada de MCH. Si bien es verdad que, estos pacientes tenían, además de las manifestaciones electrocardiográficas típicas de la MCH, trastornos de conducción y/o preexcitación ventricular.

Por lo tanto, aunque la evaluación clínica ayuda a distinguir estas patologías, los análisis genéticos establecen definitivamente la causa de una HVI.

Tabla 2: Ejemplos de fenocopias: genes, *loci* cromosómicos, proteína y tipo de herencia

FENOTIPO CLÍNICO	LOCUS CROMOSÓMICO	GEN	PROTEÍNA	HERENCIA
Fenocopia de MCH	7q36	<i>PRKAG2</i>	Subunidad 2 γ - de la proteína quinasa adenosin monofosfato activada	AD
Enfermedad de Danon	Xq24	<i>LAMP2</i>	Proteína 2 asociada al lisosoma	Ligada a X
Enfermedad de Fabry	Xq22	<i>GLA</i>	α galactosidasa A	Ligada a X
Enfermedad de Pompe	17q25.2-q25.3	<i>GAA</i>	ácido lisosomal α -1, 4-glucosidasa	AR

AD: autonómica dominante, AR: autonómica recesiva.

6.- Mutaciones en el gen *MyBPC3* y su relación con la MCH familiar

6.1.- Importancia del gen *MyBPC3* en el desarrollo de la MCH

Carrier y cols. (1993), por medio de estudios de ligamiento, relacionan, por primera vez, la MCH familiar con el cromosoma 11p13-q13, lugar donde se localiza el gen *MyBPC3* que codifica la c-MyBPC. El interés por la c-MyBPC aumenta con el descubrimiento de mutaciones en el gen *MyBPC3* asociadas a MCH familiar. En 1995 dos grupos distintos identifican, por primera vez, mutaciones, que segregan con la MCH, en el gen que codifica para la c-MyBPC (Bonne y cols., 1995; Watkins y cols., 1995).

Desde que se encontraron estas primeras mutaciones, en *MyBPC3*, han pasado más de 25 años y ya se han identificado más de 150 mutaciones. La c-MyBPC se ha convertido en una de las principales proteínas sarcoméricas implicadas en la

fisiopatología de la MCH familiar (Kunst y cols., 2000), puesto que es su causa más común (Richard y cols., 2003; Jacques y cols., 2008a). De forma que, en el 11-18% de las muestras con MCH se encuentran mutaciones en el gen *MyBPC3* (Richard y cols., 2003; Van Driest y cols., 2004a,b; Cardim y cols., 2005). Además, los distintos estudios llevados a cabo en pacientes con MCH, muestran que el 40-50% de los pacientes portadores de mutación, lo son en el gen *MyBPC3* (Richard y cols., 2003; Jacques y cols., 2008a).

Según Richard y cols. (2003) un tercio de las mutaciones, en el gen *MyBPC3*, son sustituciones de un único aminoácido (mutaciones *missense*), otra tercera parte son deleciones o inserciones que causan un cambio de pauta en la lectura (mutaciones *frameshift*), y el resto son mutaciones que causan codones *stop*, deleciones o inserciones que no producen cambio de pauta (mutaciones *in frame*), o mutaciones que afectan al *splicing*.

6.2.- Mecanismo de acción de las mutaciones en el gen *MyBPC3*

A pesar de que está establecida la importancia de este gen en la patología de la enfermedad cardiaca, se sabe poco acerca del mecanismo por el que las mutaciones en c-MyBPC causan MCH.

Se han sugerido al menos tres mecanismos mediante los cuales las mutaciones en *MyBPC3* podrían provocar su efecto:

6.2.1- La teoría del péptido venenoso

La teoría del péptido venenoso se basa en la idea de que la presencia de una forma mutada de la proteína en el sarcómero podría alterar el correcto funcionamiento del mismo. Sin embargo, algunos estudios contradicen esta hipótesis; en particular los realizados con mutaciones que provocan la aparición de codones de *stop* prematuros. En ellos no se han podido encontrar *in vivo* los péptidos truncados que se habían predicho (Carballo y cols., 2008; Rottbauer y cols., 1997; Moolman y cols., 2000).

6.2.2.- Haploinsuficiencia

La haploinsuficiencia se puede definir como la falta de una adecuada concentración de proteína que obliga a poner en marcha un mecanismo compensador de esa deficiencia, y con ello podría en último término, conducir a la hipertrofia. Los resultados obtenidos de los estudios realizados con mutaciones que causan truncamiento parecen apoyar más este mecanismo (Carballo y cols., 2008; Jacques y cols., 2008a,b). De hecho, Carballo y col. (2008) encontraron, en muestras que tenían este tipo de mutación, un 25% menos de c-MyBPC en las miofibrillas y un nivel más bajo de fosforilación que en las otras isoformas de MyBP-C (Carballo y cols., 2008).

6.2.3.- Alteraciones en la fosforilación

La enfermedad cardiaca está relacionada con cambios en la fosforilación de las proteínas contráctiles. Por lo que, el descenso de c-MyBPC fosforilada puede ser un hecho común a la disfunción contráctil e independiente de la naturaleza de la patología. Pero también, es posible que algunas de las mutaciones identificadas en el gen *MyBPC3* puedan alterar los niveles de fosforilación de la proteína y, por tanto, modifica la contractilidad muscular (Jacques y cols., 2008a).

6.3.- Aspectos clínicos de las mutaciones en *MyBPC3*

La MCH es una enfermedad compleja desde el punto de vista clínico porque se manifiesta de manera muy heterogénea entre los portadores.

En el caso concreto de los portadores de mutación en el gen *MyBPC3*, la expresión fenotípica de la enfermedad muestra un amplio rango de manifestaciones clínicas. De hecho, se puede expresar tanto, como una hipertrofia severa a edades tempranas (Lekanne y cols., 2006; García-Pavía y cols., 2007; Xin y cols., 2007), como una forma suave durante la edad adulta (Bonne y cols., 1995; Watkins y cols., 1995; Carrier y cols., 1997; Rottbauer y cols., 1997; Yu y cols., 1998; Lekanne y cols., 2006).

El fenotipo de los pacientes con MCH y mutación en el gen *MyBPC3*, puede ser consecuencia de una única mutación o de más de una, ya que pueden existir mutaciones adicionales en este gen o en otros relacionados. Además, parece que la diferente

expresión fenotípica entre los portadores de una misma mutación se puede deber a genes modificadores y factores ambientales (deporte, embarazo, etc.) (Martín y cols., 2009; García-Castro y cols., 2009).

En algunas poblaciones se identifican mutaciones con una frecuencia alta. Se trata de mutaciones que no presentan una alta mortalidad antes de la edad reproductora y que, por tanto, se pueden transmitir de generación en generación (Alders y cols., 2003). El estudio de haplotipos determina, con frecuencia, que se trata de individuos con un ancestro común.

En el gen *MyBPC3*, con frecuencia, se identifican mutaciones nuevas que aparecen en una única familia. En estos casos, la asignación de la mutación como causa de enfermedad es difícil si la penetrancia es incompleta.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La MCH es la primera causa de MS en menores de 35 años y aparece en la población con una prevalencia de 1 en 500.

El gen *MyBPC3* es donde se han identificado mayor número de mutaciones asociadas a MCH, algunas de ellas están asociadas con fenotipos severos. La identificación de mutaciones en este gen permite:

- Confirmar el diagnóstico clínico e identificar la causa específica de la enfermedad en pacientes con diagnóstico clínico establecido.
- Confirmar el diagnóstico de la causa de una MS.
- Realizar un diagnóstico diferencial en casos dudosos.
- Realizar un diagnóstico preclínico o predictivo en familiares, que permita descartar el seguimiento clínico de los no portadores. Esto abre nuevas posibilidades en la toma de decisiones clínicas preventivas en aquellos portadores de mutación que todavía no han desarrollado la enfermedad, en el establecimiento de relaciones genotipo-fenotipo, y en definitiva, en la mejora del manejo clínico de los pacientes con MCH familiar.

Existen pocas cohortes estudiadas en España, de ahí que este estudio contribuirá al conocimiento del gen *MyBPC3* aportando un número importante de familias.

Además, las relaciones genotipo-fenotipo, muchas veces, son difusas y son numerosos los estudios que requieren de la integración del conocimiento para poder inducir la patogenicidad de las mutaciones.

Por todo ello, los objetivos que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral fueron:

1. Identificar mutaciones en el gen *MyBPC3* en 130 casos índice diagnosticados de MCH. Al mismo tiempo, describir polimorfismos que pudieran estar relacionados con la enfermedad.
2. Validar la plataforma de genotipado rápido, utilizando los casos índice como controles para los genes *MYH7* y *MyBPC3* y realizar el *screening* de mutaciones conocidas en otros 13 genes, para las mismas muestras.
3. Describir, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, las posibles implicaciones estructurales de las mutaciones.

4. Estudiar la segregación familiar de las mutaciones identificadas.
5. Integrar la información obtenida con las herramientas bioinformáticas y los estudios familiares para hacer una estimación del efecto patogénico de las mutaciones identificadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Cohorte

Se incluyeron en el estudio genético del gen *MyBPC3* a 130 pacientes siguiendo cuatro criterios:

- 1) ser evaluados por cardiólogos del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).
- 2) tener un diagnóstico inequívoco de MCH siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Richardson y cols., 1996) y del grupo de trabajo de enfermedad miocárdica y pericárdica de la Sociedad Europea de Cardiología (Elliott y cols., 2008)
- 3) no pertenecer a la misma familia y
- 4) haber sido previamente genotipados para el gen *MYH7* (Laredo y cols., 2006 y datos no publicados del laboratorio).

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

2.- Análisis genéticos

2.1.- Extracción de ácido dexosirribonucleico (ADN) genómico

El ADN genómico se extrajo, a partir sangre total anticoagulada con EDTA una solución de sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético, en una concentración 0.342 mol/L, pH=7.20 (EDTA), con el *kit* de extracción y purificación NUCLEON (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó y se valoró la pureza del ADN obtenido utilizando un espectrofotómetro ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, EE.UU.). Para comprobar su integridad se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta (sistema GelDoc 2000 y *software* Quantity One/BioRad, EE.UU.).

2.2.- *Screening* del gen *MyBPC3* por SSCP

El cribado de mutaciones se hizo por medio de un análisis de polimorfismos de conformación de la cadena sencilla de ADN (SSCP= *Single strand conformation polymorphisms*).

2.2.1.- Amplificación de los exones del gen *MyBPC3* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó toda la secuencia codificante del gen *MyBPC3*, exones 1 al 34, y las regiones intrónicas flanqueantes.

2.2.1.1.- Diseño de los *primers*

Los cebadores (*primers*) se diseñaron, con el programa *Primer Express* (Applied Biosystems), utilizando como secuencia de referencia la publicada en el GenBank con el número de acceso U91629.1 [gi:2920822] (Niimura y cols., 1998). En la Tabla 3 se muestran las características de los *primers* que se utilizaron en la amplificación.

Tabla 3: *Primers* y condiciones de PCR usadas para el cribado de los exones del gen *MyBPC3*

E	Long. amplificación (pb)	Long. exón (pb)	Dirección	Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'	T ^a mt (°C)	T ^a ann (°C)
1	311	25	Fw	GACCTCAGCTCTCTGGAATTCATC	59°C	61°C
			Rv	GCTCAGAGGCCACGTCCTCGTCAA	69°C	
2	349	267	Fw	GTGCACGCTCCAACCAG	56°C	61°C
			Rv	CCCAAACCTCAGGGAAGGCTGATC	67°C	
3	285	114	Fw	TTTCCTCATCCACAGCGGGCTCAT	68°C	64°C
			Rv	CTTTTGAGACCTGCCCTGGACA	62°C	
4	186	99	Fw	GCCTGGGTGACAGAGCAAGACTCC	66°C	63°C
			Rv	CAATGCTGGGCACAGCAGCTCACAC	70°C	
5	331	149	Fw	AGCAGGACACTCCCCAAGCC	62°C	64°C
			Rv	TGCCTCCCAGATCCCCACACC	68°C	
6	302	118	Fw	CCACTCCCAGTCTCCTTTAAG	54°C	60°C
			Rv	TGGATGGGACGAGGCATCCTCCTTA	69°C	
7	213	49	Fw	GCTTCTCAAACGGCCCCCTCTG	67°C	66°C
			Rv	AGTCCGCCCCGCAAATCATCC	71°C	

E: exón. Long: longitud. pb: pares de bases. Fw: *Forward*. Rv: *Revers*. T^a mt: temperatura de *melting*. T^a ann: temperatura de *annealing*.

Tabla 3 (Continuación I): *Primers* y condiciones de PCR usadas para el cribado de los exones del gen *MyBPC3*

E	Long. amplión (pb)	Long. exón (pb)	Dirección	Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'	T ^a mt (°C)	T ^a ann (°C)
8	226	30	Fw	GGGCTGGGGATGATTG	56°C	62°C
			Rv	GGAGGGAGAAAGGGACACTA	54°C	
9	236	54	Fw	AATCTGGCTAGTGTCCCTTTCTCC	60°C	61°C
			Rv	ACACAGCTGGCAAACCACAGTGCT	66°C	
10	180	3	Fw	CCCCTCCATTATGGCTGCT	59°C	63°C
			Rv	AAGGCACAGAGACTCACCCCTG	62°C	
11	248	18	Fw	CACAACACAGGGAGTGCAAAGTG	60°C	62°C
			Rv	TGGGGGCCAAGGGAGCTGAAGA	70°C	
12	327	164	Fw	TGGCTACAGCTCCTTGGTCCT	60°C	62°C
			Rv	TATGCCCTCTCCTCTCCTGTGTA	59°C	
13	297	133	Fw	ACAGCCACAGTAGCTTGGCCT	64°C	61°C
			Rv	GTCAGAGATACGCATGTGGAG	67°C	
14+15	347	238	Rv	TTGCGGGAAAGTGAGCAGAACCAA	68°C	63°C
			Fw	ACTTCTCCCGTCGGGAACA	63°C	
16	230	106	Rv	TTGGCTCCCCTGAGGCCAT	64°C	63°C
			Fw	ATGTGGGAACCTGGGGAGGAGAT	77°C	
17	299	167	Rv	TGTGGCCTCTTCTGGGCAGAT	63°C	64°C
			Fw	GGCATCTGCCCAGAAGAGGCCACAGCAC	76°C	
18	268	166	Rv	TGCTCCCCTACAGGGCTAGGTG	63°C	61°C
			Fw	ACAGGGATTACGCCACACC	62°C	
19+20	405	242	Rv	CAGTCTCCACCTGTCCCATC	56°C	64°C
			Fw	CAGAATACCAACAAGCCAGGACAAGG	65°C	
21	236	140	Rv	TTGCGGGAAAGTGAGCAGAACCAA	68°C	61°C
			Fw	TCCTCTGGCTCTCCCGTTTCTCT	66°C	
22	257	81	Rv	CCACACACCCATCTTATAGATGGGG	63°C	62°C
			Fw	AAGAAGCAGCAGAGGGGCGCTT	66°C	
23	259	160	Rv	AAGTGTGGCACCTCCATGGAGA	63°C	65°C
			Fw	GCAAGGGCCTCTGGGGTCTGACTTG	70°C	
24	283	105	Rv	GGCTGCCCTCTGTGTTCTCCA	67°C	62°C
			Fw	CCTGTGGCGGTTAGTTGG	56°C	
25	308	189	Rv	TCTGGAACCCAGGCATCCCCACAC	71°C	63°C
			Fw	CCGAGGGAAGGTGGTGTGG	62°C	
26	278	135	Rv	GGAGGTTTTTAACTGGGGAGGGG	64°C	63°C
			Fw	TTCAGAGTCTAGGGCATGGATCTCCA	65°C	
			Rv	GAATCTGCTCAATGGCAAGGTG	61°C	

E: exón. Long: longitud. pb: pares de bases. Fw: *Forward*. Rv: *Revers*. T^a mt: temperatura de *melting*. T^a ann: temperatura de *annealing*.

Tabla 3 (Continuación II): *Primers* y condiciones de PCR usadas para el cribado de los exones del gen *MyBPC3*

E	Long. amplicón (pb)	Long. exón (pb)	Dirección	Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'	T ^a mt (°C)	T ^a ann (°C)
27	261	168	Fw	TGTCAGTGGTGACACAGCCTGTG	63°C	64°C
			Rv	GGTGCAATGGCGGGTCTTGT	63°C	
28	183	89	Fw	AGAGCTGTGGCGGGCCCTCACTTA	70°C	64°C
			Rv	CACTATAGCCTCTCTCCCCTGGGG	64°C	
29	297	196	Fw	GGCCGGCCCTTGGAGTGAT	65°C	64°C
			Rv	AGCCCAGGGAAGGGAAACAAGGGG	70°C	
30	271	140	Fw	ACTGTCAGGAGGCGTGGTGA	60°C	63°C
			Rv	CACGGTGAGGACAGTGAAGGGTAGC	66°C	
31	310	160	Fw	AGAGGCTCTCGGCATCAGGAA	62°C	61°C
			Rv	CGAGAGGCCACACAAAGCTA	58°C	
32	232	137	Fw	GGCCTCTCGGTACCAAGTCTGTGTC	65°C	64°C
			Rv	CAACGTCGGGGCCTGTGAGC	67°C	
33	283	187	Fw	CCCTCTCAGCCTGGATGGCT	63°C	63°C
			Rv	CCGCCCGCTCTTCCCATCTC	67°C	
34	178	11	Fw	TTCCAGAAGGCTGGGAGGA	59°C	62°C
			Rv	GCCCTACAGCCTCCCATTACT	62°C	

E: exón. Long: longitud. pb: pares de bases. Fw: *Forward*. Rv: *Revers*. T^a mt: temperatura de *melting*. T^a ann: temperatura de *annealing*.

Se utilizaron los mismos *primers* para la realización de las reacciones de secuenciación, con la excepción de los fragmentos que aparecen detallados en la Tabla 4.

Tabla 4: *Primers* específicos de secuenciación

Exón	Longitud Amplicón (pb)	T ^a de <i>annealing</i>		Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'	T ^a de <i>melting</i>
10	185	61°C	Fw	TCGGCCCAACTGACTTATGTTC	60°C
			Rv	TGAGTCTCTCACCACAGCCTCT	58°C
17	396	63°C	Fw	ATTGGTGAGTTCCAGAAGCAGC	60°C
			Rv	GGATGAGGTTTAGGCTGTCAAAGG	61°C
18	362	60°C	Fw	ACAGGCACACGTGTTTTTAC	56°C
			Rv	TCTCTGTCTCCATCTCAGTCTC	56°C
19+20	330	63°C	Fw	TGTGTGGCCAGTGGGGT	62°C
			Rv	GCGGGAAAGTGAGCAGAACC	61°C
23	410	62°C	Fw	CGGTGCCACAGAGATGATTTTG	61°C
			Rv	GTTTGTGCGAGTGGCTGAATGAG	58°C
24	372	62°C	Fw	GTTAGTTGGAGTGGGAAGGGGA	60°C
			Rv	CTCCTGAATCAGGTCGAAGTTCAG	60°C
30	422	61°C	Fw	CACAGCTCACATTTCCAGTCC	58°C
			Rv	CTTGGCATCTCCACCCTACTAT	59°C

pb: pares de bases. Fw: *Forward*. Rv: *Revers*.

2.2.1.2.- Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla de reacción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo en un volumen final de 25 μ L con *Buffer* 1X, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M primer *forward* (Fw) y *reverse* (Rv), 200 μ M de cada desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y 0.2 μ g de ADN genómico. Para comprobar que no había habido contaminación, en cada mezcla de reacción de PCR, se incluyó un blanco de reactivo.

La reacción constó de una primera desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de: 94°C durante 30 s, la temperatura de *annealing* correspondiente durante 30 s (Tabla 3), y 72°C durante 45 s. A todas las PCRs se les añadió una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. Las PCRs se realizaron en termocicladores automáticos Perkin Elmer/GeneAmp 9700.

Los productos de la amplificación se chequearon por electroforesis (ver apartado 2.1). Para comprobar el tamaño de nuestros fragmentos, en las electroforesis se cargó un marcador de cuantificación de 100 pares de bases (pb) HyperLadder IV (Bioline).

2.2.2.- Análisis de la conformación de las cadenas sencillas de ADN

El *screening* de variantes se realizó mediante la técnica conocida como SSCP. Se utilizaron geles de poliacrilamida comerciales 15/24 (T = 15%, C = 2% -GeneGel-Amersham Biosciences), buffers de rehidratación: *buffer* A (pH 9.0) y *buffer* C (pH 8.3) y los correspondientes tampones para los electrodos suministrados por la misma casa comercial.

Se mezclaron 3 μ L de producto de PCR con igual cantidad de *buffer* de carga (formamida al 95% y azul de bromofenol 5%). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min, se mantuvieron en hielo, se cargaron en geles, hidratados previamente al pH seleccionado, y se sometieron a electroforesis en un equipo GenePhor Electrophoresis Unit (Pharmacia Biotech). La optimización de la temperatura de cada pH y de cada exón se hizo pasándolos, en un primer paso, a 12°C y en función del patrón de bandas obtenido se escogió una segunda temperatura. En general, para aquellos fragmentos en que no se formaban heterodúplex se probó a menor temperatura y en aquellos en que las electroforesis quedaban borrosas o con muchas bandas se aumentó la temperatura.

La visualización de las bandas se consiguió mediante una tinción manual de nitrato de plata. Mediante fijación con etanol 10% durante 10 min, solución de HNO₃ durante 3 min, lavado 6 min, tinción durante 20 min, lavado 1 min, revelado con NaCO₃ 3%, tiosulfato sódico 2% y formaldehído, lavado durante unos segundos y solución *stop* de ácido acético 10%.

2.2.2.1.- Condiciones de optimización de las SSCP

Se optimizaron las condiciones para las SSCP de los 34 exones que codifican para la cMyBP-C. Cada fragmento se pasó por dos pH, las condiciones eléctricas se ajustaron a los tamaños de los fragmentos (Tabla 5) y se siguieron las recomendaciones del fabricante con pequeñas modificaciones.

Tabla 5: Condiciones eléctricas de las electroforesis de las SSCP

pH	FASE 1	FASE 2
8.3	80 V, 5 mA, 5 W, 35 min	510 V, 15 mA, 10 W, 80 min
9.0	120 V, 8 mA, 5 W, 45 min	800 V, 22 mA, 13 W, 35 min

La optimización de las temperaturas se hizo de manera individual para cada fragmento y cada pH (Tabla 6). El patrón de bandas de cada pH fue independiente de la temperatura.

Tabla 6: Condiciones óptimas de temperatura para las electroforesis de las SSCP

pH	Temperatura (°C)	Exones
	5	4, 7, 19+20, 21, 22, 26, 27, 31, 33, 34
	8	2, 3, 8, 12, 16,
8.3	12	1, 5, 17, 24, 25, 28, 29, 30
	16	13
	20	6, 9, 10,11,14+15, 18, 23, 32

Tabla 6 (Continuación): Condiciones óptimas de temperatura para las electroforesis de las SSCP

pH	Temperatura (°C)	Exones
9.0	5	4, 7, 16, 17, 21, 28, 29, 33
	8	19+20
	12	2, 3, 8, 12, 22, 23, 25, 31, 34
	16	13
	20	1,6, 5, 9, 10, 11, 14+15, 18, 24, 26, 27, 30, 32

2.2.3.- Secuenciación

Los productos amplificados se purificaron con columnas Millipore, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de secuenciación se utilizó el Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Star Master Mix (Beckman Coulter, EE.UU.). La mezcla de reacción y condiciones de PCR de secuenciación se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante. La temperatura de *annealing* de la reacción se estableció 5°C por debajo de la temperatura de *melting* del *primer* utilizado, y entre valores mínimos de 50°C y máximos de 60°C. La reacción de secuenciación se detuvo con una solución *stop* de acetato sódico 3 M pH 5.2, EDTA 100 mM pH 8.0 y glicógeno al 20 mg/mL. El producto de la reacción se precipitó con etanol absoluto y se lavó con etanol 70%. Finalmente, las muestras se resuspendieron en el *buffer* SLS (Beckman Coulter, EE.UU.). La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador automático CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, EE.UU.).

2.2.3.1.- Estudio de sensibilidad

La sensibilidad de la SSCP depende de factores como la temperatura, pH, tiempo de electroforesis, composición y tamaño de los fragmentos. Cuando los parámetros que afectan a la separación están optimizados para un fragmento de ADN, en concreto, se convierte en una técnica muy sensible (Glavac y Dean., 1993; Salazar y cols., 2002) pudiendo alcanzar valores del 95-97%. Con el fin de testar la sensibilidad

de las condiciones utilizadas para llevar a cabo el cribado en este estudio, se secuenció el exón 12 de las 130 muestras.

2.2.3.2.- Secuenciación de fragmentos con movilidad anormal

Se secuenciaron aquellos fragmentos para cada uno de los pacientes que se seleccionaron por su movilidad anormal en el *screening* por SSCP y, por tanto, que eran sospechosos de tener una variante: mutación y/o polimorfismo.

Aquellos fragmentos de cada uno de los pacientes que se seleccionaron por sus patrones aberrantes en SSCP se reamplificaron de manera independiente y se secuenciaron. Se utilizaron los *primers* descritos en la Tabla 3, excepto para los exones que se resumen en la Tabla 4. Tanto la PCR como la cuantificación del producto amplificado se hicieron según se describió en el apartado 3.2. y la secuenciación se realizó según se el procedimiento explicado en el apartado 2.2.3.

2.2.3.3.- Confirmación de las variantes no sinónimas por secuenciación

Las variantes no sinónimas se confirmaron por secuenciación, partiendo de una PCR nueva.

Una variante se consideró mutación si aparecía con una frecuencia inferior al 1% en 200 individuos no relacionados de controles adultos sanos, y si el residuo mutado estaba conservado entre especies e isoformas.

2.3.- *Screening* de mutaciones conocidas por plataforma de genotipado SEQUENOM

Se analizaron los 130 pacientes en una plataforma de genotipado desarrollada por la *spin off* de la UDC surgida del grupo de investigación GRINCAR, Health in Code S.L.. La plataforma se diseñó para detectar más de 500 mutaciones descritas en 14 genes sarcoméricos (*TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TPM1*, *ACTC*, *TTN*, *MYL2*, *MYL3*, *MYH6*, *MYH7*, *MyBPC3*, *TCAP*, *MYO6*, *MYLK2*) mediante espectrofotometría de masas.

Los objetivos principales de este *screening* eran:

- testar la sensibilidad de la plataforma e
- identificar, en los casos índice, la presencia de mutaciones adicionales, en otros genes responsables de MCH.

Además, los resultados obtenidos sirvieron de sistema de control de calidad de los resultados obtenidos por SSCP.

2.3.1.- Estrategia de desarrollo de la plataforma de genotipado SEQUENOM

Se colaboró en el diseño, puesta a punto y validación de la plataforma de genotipado tal como se indica en el apartado 2.3.1.1 y 2.3.1.2. Las 130 muestras que han sido analizadas para el gen *MyBPC3*, en esta Tesis Doctoral, se utilizaron como parte de los controles en la validación de la plataforma.

2.3.1.1.- Identificación de secuencias de referencia y de mutaciones conocidas

El primer paso en el diseño de la plataforma consistió en realizar una revisión bibliográfica que incluyera todas las mutaciones descritas, hasta 2006, en 14 genes sarcoméricos y asociadas con MCH. La revisión se llevó a cabo utilizando las siguientes bases de datos:

- **MEDLINE Entrez** (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Es una base de datos de publicaciones que pertenece a la *National Library of Medicine* (NLM). Dispone de información bibliográfica del campo de la biomedicina, con citas a más de 4500 revistas.
- **Cardiogenomics** (*Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School*. URL: <http://www.cardiogenomics.org>). Cardiogenomics es uno de los once programas para Aplicaciones Genómicas fundado por la *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) del *National Institutes of Health* de Estados Unidos (NIH). Se creó con la idea de avanzar en la investigación genómica relacionada con enfermedades del corazón. Contiene un proyecto dedicado a recoger mutaciones que se han relacionado con la MCH.

- **HGMD** (*The Human Gene Mutation Database del Institute of Medical Genetics en Cardiff*. URL: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). HGMD es una base de datos de acceso gratuito en la que se recogen mutaciones en genes relacionados con enfermedades genéticas humanas, entre ellas la MCH.

Posteriormente, se seleccionaron las 14 secuencias genómicas de referencia en el GenBank, que es la base de datos de secuencias genéticas del NIH.

Por último, se localizaron, a nivel genómico y en cada una de esas secuencias, las mutaciones descritas en la bibliografía, paso fundamental para el diseño de los *primers* necesarios en las PCRs *multiplex* y las reacciones de extensión.

2.3.1.2.- Inclusión de las mutaciones identificadas en el laboratorio.

Además de las mutaciones descritas en la literatura, se incluyeron en el diseño de la plataforma aquellas mutaciones identificadas en el laboratorio gracias al *screening*, por SSCP, llevado a cabo en esta Tesis Doctoral (Apartado 2.2 de resultados).

2.3.2.- Ensayo iPLEX® GOLD de Sequenom

El ensayo iPLEX® Gold ([URL:www.sequenom.com/Genetic-Analysis/Applications/iPLEX-Genotyping/iPLEX-Overview.aspx](http://www.sequenom.com/Genetic-Analysis/Applications/iPLEX-Genotyping/iPLEX-Overview.aspx)) se basa en la realización de PCRs *multiplex* (genotipado múltiple en una única reacción) seguidas de una reacción de extensión de un único *primer* (Figura 14). Los productos de la extensión se analizan usando un espectrofotómetro de masas (MALDI-TOF MS). Esta tecnología permite la detección de inserciones, deleciones, sustituciones y otras variantes en ADN amplificado en un número elevado de muestras de forma simultánea.

El *software* de diseño de Sequenom (SEQUENOM's Assay Design software) combina las distintas variantes a testar en cada una de las *multiplex* a genotipar y diseña las secuencias de los *primers* necesarios para el procesado de las muestras.

Esta tecnología está diseñada para el genotipado de un número alto de muestras, de forma que generalmente se trabaja con placas de 96 y 384 pocillos, y la transferencia tanto de las muestras como de los reactivos se lleva a cabo con robots pipeteadores. Así mismo, las reacciones para el procesado de las muestras se llevan a cabo en termocicladores duales de 384 pocillos que permiten el genotipado de un alto número de muestras simultáneamente.

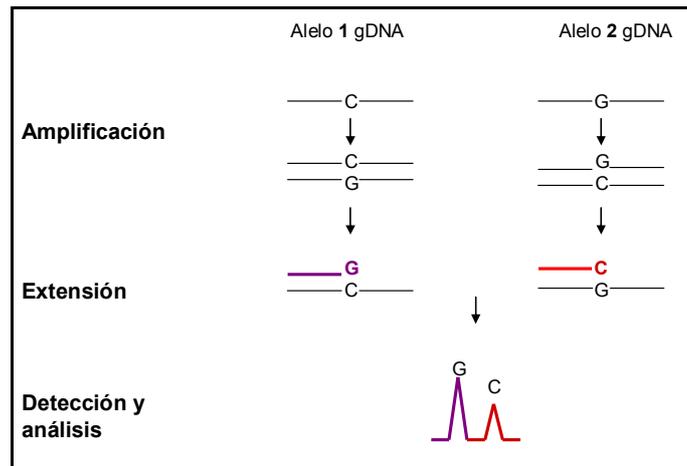


Figura 14: El ensayo iPLEX® Gold permite el genotipado de varias variantes en una única reacción. En la figura se representa la amplificación, extensión y detección para una de las variantes que constituyen un determinado *mix*. El espectrofotómetro de masas (MALDI-TOF MS) es capaz de detectar la variante en estudio tanto en homocigosis como en heterocigosis.

2.3.2.1.- Preparación placa de ADN

Las muestras de ADN se diluyeron a una concentración final de 5-10 ng/ μ L y se transfirieron 2 μ L de cada una de ellas a la placa de reacción.

2.3.2.2.- Preparación de las mezclas de los *primers*

Se prepararon las mezclas de los *primers*, a una concentración final de 1 μ M, necesarias para cada una de las PCR *multiplex*.

2.3.2.3.- Amplificación del ADN mediante PCR

Se amplificó el ADN mediante reacciones PCR *multiplex* (Tabla 7) empleando termocicladores automáticos Perkin Elmer/GeneAmp 9700. Cada reacción constó de una primera desnaturalización de 94°C durante 15 min, seguida de 45 ciclos de: 94°C (20 s), 56°C (30 s) y 72°C (60 s). A todas las PCRs se les añadió, durante 3 min, una etapa de extensión final a 72°C.

Tabla 7: Mezcla de PCR

Reactivo	Concentración en 5 μ L	Volumen
ADN (5-10 ng/ μ L)	2-4 ng/ μ L	2 μ L
Agua (grado HPLC)	-	1.2 μ L
Buffer de PCR (10X)	1.25X	0.625 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.625 nM	0.325 μ L
dNTP (25 mM each)	500 μ M	0.25 μ L
Mix de <i>primers</i> de PCR (1 μ M)	100 μ M	0.5 μ L
HotStar Taq ADN polymerase (5 U/ μ L)	0.5 U/reacción	0.1 μ L
Volumen Total		5 μL

2.3.2.4.- Tratamiento con SAP (*shrimp alkaline phosphatase*)

Se neutralizaron los dNTPs no incorporados mediante la incubación de la PCR con fosfatasa alcalina SAP. Para ello, se preparó la mezcla de SAP (Tabla 8) y se añadieron 2 μ L al producto amplificado en la reacción anterior. La incubación se hizo a 37°C durante 40 min y la inactivación de la enzima se logró a 85°C durante 5 min.

Tabla 8: Mezcla de SAP

Reactivo	Volumen
Agua (grado HPLC)	1.53 μ L
Buffer SAP (10X)	0.17 μ L
Enzima SAP (1.7 U/ μ L)	0.30 μ L
Volumen Total	2 μL

2.3.2.5.- Extensión de una única base (SBE, *single base extension*)

Se incluyeron los *primers* de extensión (secuencias de ADN diseñadas en la posición adyacente a cada variante de la *multiplex*) y una mezcla de los 4 nucleótidos, cada uno de ellos con una modificación en su masa que permitía identificarlos y que provocaba la paralización de la reacción una vez eran incorporados al *primer* de extensión (Tabla 9). El programa de extensión constó de un ciclo de 94°C (30 s), 45 ciclos de: 94°C (5 s), 52°C (5 s) y 80°C (5 s) y una extensión final de 72°C durante 3 min. De esta forma, la reacción de extensión iPLEX GOLD generó productos de extensión alelo-específicos de diferentes masas en función de la secuencia analizada. Estos productos fueron detectados posteriormente mediante espectrofotometría de masas.

Tabla 9: Mezcla de extensión para *multiplexes*

<i>multiplexes de grado bajo</i>		
Reactivo	Concentración en 9 μL	Volumen/reacción
Agua (grado HPLC)		0.7395 μ L
iPlex <i>Buffer</i> Plus (10X)	1.222X	0.200 μ L
iPlex <i>termination mix</i>	0.5X	0.100 μ L
<i>Mix</i> de <i>primers</i> de extensión (7-14 μ M)	0.625-1.25 μ M	0.940 μ L
Enzima iPlex	0.5X	0.0205 μ L
Volumen Total		2 μL
<i>multiplexes de grado alto</i>		
Reactivo	Concentración en 9 μL	Volumen/reacción
Agua (grado HPLC)		0.619 μ L
iPlex <i>Buffer</i> Plus (10X)	0.222X	0.200 μ L
iPlex <i>termination mix</i>	1X	0.200 μ L
<i>Mix</i> de <i>primers</i> de extensión (7-14 μ M)	0.625-1.25 μ M	0.940 μ L
Enzima iPlex	1X	0.041 μ L
Volumen Total		2 μL

2.3.2.6.- Dilución y tratamiento con resina

Se diluyeron las muestras con 25 μ L de agua y se limpiaron las sales presentes en los productos de reacción mediante una resina (*Clean Resin* de SEQUENOM). Con este paso se minimizó la presencia de posibles fragmentos adicionales a los fragmentos de interés y, por tanto, se optimizaron los resultados del análisis por espectrofotometría de masas.

2.3.2.7.- Transferencia de los productos de extensión al SpectroCHIP Bioarray

Los productos purificados se dispensaron en un SpectroCHIP Bioarray empleando el robot nanodispensador MassARRAY de Samsung.

2.3.2.8.- Análisis de los fragmentos de extensión y genotipado

Los productos de extensión alelo-específicos de diferentes masas generados durante el procesamiento de las muestras se detectaron mediante espectrofotometría de masas empleando el sistema de detección basado en la tecnología MALDI-TOF incorporada en el Bruker Autoflex o el MassARRAY Analyzer Compact. El procesamiento y el análisis de cada iPLEX SpectroCHIP se llevó a cabo empleando el *software*

MassARRAY Workstation, que traduce de forma automática los tamaños de los fragmentos generados durante la extensión de base única en los genotipos de las distintas variantes.

2.3.2.9.- Confirmación de los resultados por secuenciación

Los resultados positivos se confirmaron por secuenciación, partiendo de una PCR nueva.

3.- Datos clínicos de los casos índices

La recogida y análisis de los datos clínicos de los 130 casos índices fueron llevados a cabo por el Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias y su equipo. Se realizó un seguimiento prospectivo que constaba de recogida de antecedentes personales y familiares, síntomas, exploración física, electrocardiograma, ecocardiograma, prueba de esfuerzo, Holter, tratamientos y eventos cardiovasculares relacionados.

4.- Estudio bioinformático: análisis de secuencias

4.1.- Conservación de nucleótidos y aminoácidos

Se realizó el alineamiento múltiple de secuencias para evaluar la conservación de los nucleótidos implicados en las mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral. Para ello se utilizó la herramienta de alineamiento genómico que tiene disponible el *software* Ensembl (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Alignments). Se compararon las secuencias genómicas de siete mamíferos (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Canis familiares*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Pan troglodytes* y *Rattus norvegicus*).

Además, se comprobó la homología existente entre las tres isoformas de la proteína C de unión a miosina en las regiones donde se producen las mutaciones. Para ello se utilizó la herramienta de alineamiento aminoacídico (ClustalW) que tiene disponible Protein Knowledge Base (<http://services.uniprot.org/clustalw/clustalw2>).

4.2.- Análisis bioinformático de mutaciones con cambio de sentido

4.2.1- Propiedades físico-químicas de los aminoácidos

Los aminoácidos constituyen el alfabeto de la estructura de las proteínas y van a determinar muchas propiedades importantes de las proteínas. Sus propiedades físico-químicas dependen, en gran medida, del grupo radical que llevan incorporado.

Se estudiaron los cambios experimentados en las mutaciones *missense* como consecuencia de la sustitución de un aminoácido por otro. Los datos referentes a su grado de hidrofobicidad, masa y posibilidad que existe de intercambio entre uno y otro están disponibles en la página: <http://prowl.rockefeller.edu/aainfo/mutation.html>.

Se obtuvieron gráficas que mostraban los cambios de hidrofobicidad provocadas por la sustitución de un aminoácido por otro a través de la *World Wide Web*: www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-protean.aspx, que utiliza la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle para determinar el carácter hidrofóbico de las proteínas. Las regiones con valores por encima de 0 son de carácter hidrofóbico. La polaridad relativa de cada aminoácido ha sido determinada experimentalmente midiendo el cambio de energía libre al trasladar un residuo dado de un solvente hidrofóbico al agua. La energía libre de transferencia varía desde muy exergónica para residuos cargados o polares a muy endergónica para aminoácidos con cadenas laterales aromáticas o alifáticas. Para estimar la hidrofobicidad total de una secuencia de aminoácidos, se suman las energías libres de transferencia para dichos residuos, obteniendo un índice hidropático para la región en estudio.

4.2.2.- Impacto potencial de la sustitución de un aminoácido por otro

Existen diversas herramientas automáticas para la predicción del posible impacto, de la sustitución de un aminoácido por otro, sobre la estructura y la función de una proteína humana. Las predicciones se basan en reglas empíricas que se aplican sobre la información filogenética y estructural que se tiene de la secuencia problema o de proteínas de la misma familia, obtenida gracias a grandes redes neuronales.

Estos programas:

- Comparan cambio de carga, masa, hidrofobicidad, reemplazan el aminoácido salvaje por el mutante en estructuras 3D, si éstas son conocidas.

- Valoran si la sustitución es capaz de destruir el *core* hidrofóbico de la proteína o de variar interacciones (electrostáticas, con ligandos, etc.).
- Chequean contactos con todas las estructuras proteicas relacionadas, interacciones entre las subunidades de la molécula proteica y contactos con sitios funcionales.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes predictores:

4.2.2.1.- Polyphen

Polyphen (*Polymorphism Phenotyping*) calcula la diferencia entre los valores obtenidos para la variante salvaje y la mutante. Diferencias grandes pueden indicar que la sustitución estudiada es rara o que nunca se ha observado en la familia de la proteína en estudio.

La predicción resulta ser:

- Probablemente perjudicial (afecta a la función y a la estructura de la proteína con alta confianza) si la diferencia es mayor de 2.
- Posiblemente perjudicial (se supone que afecta a la función y a la estructura de la proteína) para diferencias entre 1.5-2.
- Benigna (probablemente carece de cualquier efecto fenotípico) cuando la diferencia entre el valor salvaje y mutante está por debajo de 1.5.

El *software* está disponible en la página: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/#PredictionBasis>

4.2.2.2.- PMut

En el *software* PMut la predicción se hace mediante una red neuronal, en la que se evalúan 15 parámetros. El porcentaje de éxito es del 83.5% cuando se incluye solo información derivada de la secuencia, pero cuando se evalúa la estructura el porcentaje de éxito asciende a 87.0%.

Un valor mayor de 0.5 se predice como patológico. La fiabilidad varía entre 0 (baja fiabilidad) y 9 (muy fiable).

El *software* está disponible en: <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>

4.2.2.3.- SIFT

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) predice si la sustitución de un aminoácido afecta a la función de la proteína. Se basa en la homología de secuencia y en las propiedades físicas de los aminoácidos. Cuando el *score* que nos da el programa para predecir el efecto de la mutación es menor de 0.05 considera que ésta es deletérea, mientras que si el valor es mayor de 0.05 considera que es tolerable.

El *software* está disponible en: <http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>

4.2.3.- Predicción de la estructura secundaria: Implicaciones en la estructura de láminas beta y hélices alfa: GOR V

El algoritmo de GOR V combina información teórica, estadística Bayesiana e información evolutiva para predecir la probabilidad de estructura secundaria de cada aminoácido. En la versión utilizada, el método alcanza una precisión en la predicción del 73.5% (Kloczkowski y cols., 2002; Sen y cols., 2005).

El algoritmo GOR V reduce los diferentes elementos estructurales en tres estados de estructura secundaria: hélice α (α -*helix*), Beta-lámina (β -*sheet*) y *coil*. En el GOR V, las hélices α se representan por la letra H, las Beta-láminas por la letra E y los giros β se representan por la letra C.

El programa GOR predice la estructura secundaria de una determinada secuencia de aminoácidos, calculando las probabilidades p_H, p_E y p_C para cada residuo, a lo largo de toda la secuencia. Generalmente, los estados predichos se corresponden con los que dan una probabilidad más alta, pero a veces el programa hace excepciones a esta regla.

El *software* está disponible en: <http://gor.bb.iastate.edu/>

4.3.- Análisis bioinformático de mutaciones que causan un cambio de pauta en la lectura del ácido ribonucleico mensajero (ARNm)

Se utilizaron herramientas de alineamiento local (programas BLAST) para comparar las secuencias con cambios de pauta en la lectura con la secuencia de referencia. De este análisis se obtuvo la localización de los codones *stop* prematuros.

4.4.- Análisis bioinformático de mutaciones que afectan al *splicing*: Identificadores de sitios aceptores y donadores de *splicing*

Se han desarrollado diversos algoritmos que permiten realizar predicciones fiables del efecto de mutaciones en el *splicing*. Se utilizaron programas (Tabla 10) capaces de identificar sitios aceptores y donadores dentro de un segmento genómico, permitiendo predecir si los cambios producidos en los intrones se localizan en estos sitios. Estos programas desarrollan algoritmos que asignan un valor a cada sitio identificado en función de la probabilidad que tengan de formar parte de un sitio donador/aceptor de *splicing*.

Tabla 10: Programas identificadores de sitios aceptores y donadores de *splicing*

Splice Site Prediction by Neural Network (NNS)	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
Netgene2 v2.4	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
Splicesitefinder (SSF)	http://violin.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html
Human Splicing Finder Splice site analysis (HSF)	http://www.umd.be/HSF/
Alternative Splice Site Predictor (ASSP)	http://www.es.embnet.org/~mwang/assp.html

5.- Estudios familiares

Se invitó a familiares de los casos índices a realizar una revisión que constaba de estudio clínico, ECG, ECO y estudio genético. La recogida de muestras y su seguimiento fue llevada a cabo por el Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias y su equipo.

Se testó la presencia de la mutación problema, para los familiares de los casos índice, mediante secuenciación de ADN.

RESULTADOS

1.- Análisis genéticos

1.1.- *Screening* del gen *MyBPC3* por SSCP y secuenciación de fragmentos con movilidad anormal.

El cribado por SSCP del gen *MyBPC3* y la posterior secuenciación de los fragmentos con movilidad anormal concluyó con la identificación de 16 mutaciones diferentes en 20 de los 130 casos índice (15.4%). Trece de las variantes ocurrieron en nueve de los 34 exones estudiados y tres en regiones intrónicas flanqueantes (Tabla 11).

Tabla 11: Mutaciones en el gen *MyBPC3*

Tipo	Mutación	E/I	Seq. ref. U91629.1	Familia	Referencia
<i>Missense</i>	D75N*	E2	g2374G>A	H73	Esta Tesis Doctoral
<i>Missense</i>	A216T	E5	g3898G>A	H42	Fokstuen y cols., 2008
<i>Missense</i>	V471E*	E16	g10774T>A	H279	Esta Tesis Doctoral
<i>Missense</i>	R495W	E17	g10930C>T	H161	García-Castro y cols., 2009
<i>Missense</i>	R502Q	E17	g10952G>A	H614, H147	Niimura y cols., 1998
<i>Missense</i>	E542Q	E17	g11071G>C	H153, H641, H166	Carrier y cols., 1997
<i>Missense</i>	T957S	E27	g18572C>G	H120	Ehlermann y cols., 2008
<i>Missense</i>	R1022P	E29	g19966G>C	H49, H18	Brito y Madeira, 2005
<i>Missense</i>	E1179K	E32	g20989G>A	H95	Brion y cols., 2009
Delección	Q327fs*	E12	g7364delG	H13	Esta Tesis Doctoral
Delección	K504del	E17	g10957-59delAAG	H46	Richard y cols., 2003
Delección	K600fs	E19	g 12413delA	H37	Richard y cols., 2003
Delección	P955fs	E27	g 18566-67delCT	H160	Niimura y cols., 1998
<i>Splicing</i>	IVS6+5G>A*	I6	g5261G>A	H56	Esta Tesis Doctoral
<i>Splicing</i>	IVS11-9 G>A*	I11	g7301G>A	H110	Esta Tesis Doctoral
<i>Splicing</i>	IVS29+5G>A	I29	g20096G>A	H131	Yu, 2005#:

E, exón; I, intrón; seq. ref., secuencia de referencia. * No descrita previamente; #:abstract no publicado (Yu, HUGO's 10th Human Genome Meeting, Poster 279).

En todo el estudio se encontraron tres mutaciones en los intrones, dos afectaban a la secuencia donadora y una a la secuencia aceptora de *splicing*. La mutación IVS29+5G>A se había citado, con anterioridad, en una ocasión. Mientras que en el caso de las otras dos (IVS6+5G>A y IVS11-9G>A) se hace la primera descripción en esta Tesis Doctoral (Tabla 11).

De las mutaciones identificadas en los exones, nueve fueron mutaciones *missense* (2 nuevas: D75N, V471E) y cuatro deleciones (1 nueva: Q327fs). Tres de las deleciones causaron un cambio de pauta en la lectura de los aminoácidos (*frameshift*) y la cuarta provocó la delección de un aminoácido (Tabla 11).

Las 16 variantes se consideraron mutación porque se produjeron en residuos conservados y aparecieron en 200 individuos sanos no emparentados con una frecuencia <0.01.

Las mutaciones *missense* identificadas en esta Tesis Doctoral se concentraron en 6 motivos: una mutación en C0, C1, C7, C8 y C10, respectivamente y cuatro en C3 (Figuras 15 y 16). Tres de las mutaciones *missense* se encuentran en dominios que están directamente implicados en la unión a miosina (C0, C1 y C10) y dos están localizadas en dominios implicados en la interacción de la proteína con la titina (C8 y C10). En definitiva, tres de las mutaciones (T957S, R1022P y E1179K) se localizan en dominios implicados en la incorporación de la proteína C de unión a la miosina en la banda A del sarcómero (C7, C8 y C10) y dos (D75N y A216T) en dominios implicados en la interacción con la actina y con la región S2 de la miosina, respectivamente. Mientras que las cuatro mutaciones restantes (V471E, R495W, R502Q y E542Q) se identificaron en el dominio C3. Además, en este dominio se identificó la mutación K504del.

Las mutaciones *frameshift* identificadas provocaron un cambio de pauta en la lectura de los aminoácidos a distintos niveles de la estructura de la proteína: Q327fs en S2 *binding*, K600fs en C4 y P955fs en C7 (Figuras 15 y 16).

El patrón de moviidades anormales y su posterior secuenciación permitió identificar, además de las 16 mutaciones mencionadas anteriormente, otras 15 variantes. De las que 12 aparecían recogidas en la base de datos pública *Single Nucleotide Polymorphisms* (dbSNP) del *GenBank Database*, por lo que tenían identificador rs (*reference_SNP*).

Tres de ellas se dieron en regiones intrónicas flanqueantes (IVS4-12insC, IVS23+18C>G, IVS26+12C>T) y doce se produjeron dentro de los exones. De estas

últimas, siete no producen cambio de aminoácido, son variantes sinónimas, (G164G, T262T, V849V, E1096E, P2P, L717L, V748V) y cinco son variantes *missense* (V158M, V189I, S236G, R326Q, R820Q) (Tabla 12).

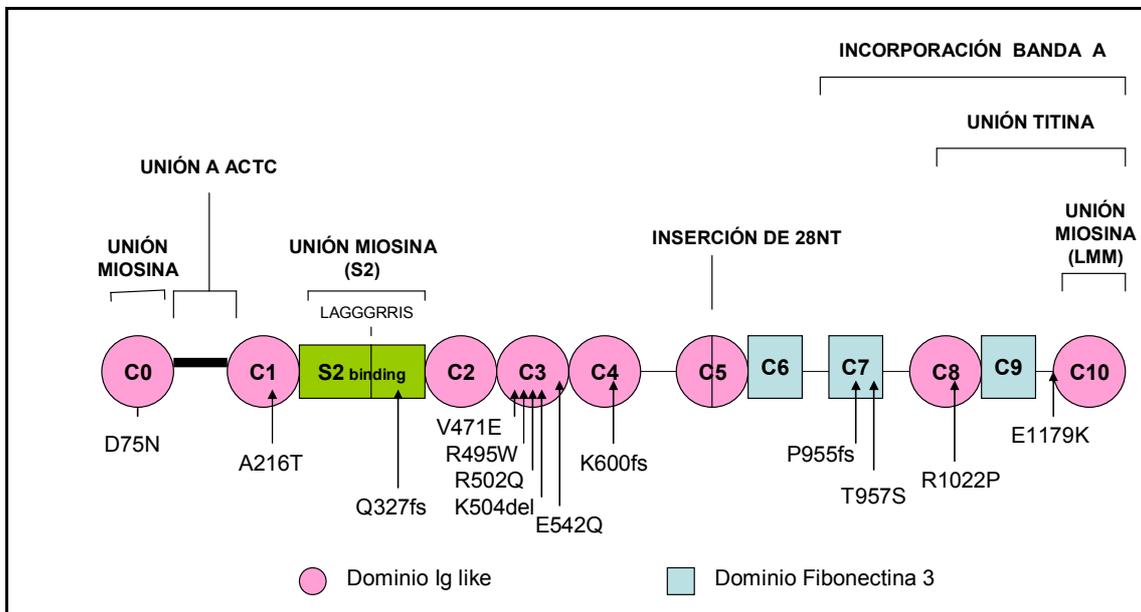


Figura 15: Representación de la estructura secundaria de la c-MyBPC y localización de las mutaciones exónicas identificadas en esta Tesis Doctoral.

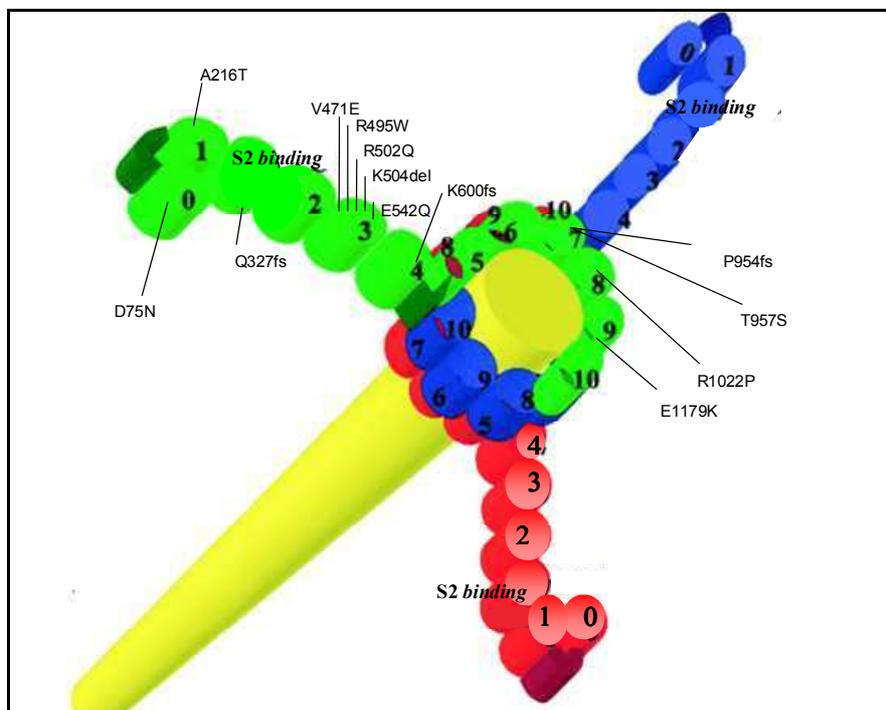


Figura 16: Localización de las mutaciones exónicas identificadas en esta Tesis Doctoral según el modelo de collar trimérico de la MyBP-C, propuesto por Flashman y cols. (2004).

Tabla 12: Polimorfismos encontrados en pacientes con MCH

Exón/Intrón	SNP	Secuencia ref.: gi 2920822	Cambio codón	Genotipo				GenBank database	
				Z/Z Frecuencia	Z/z Frecuencia	Alelo Z Frecuencia	Alelo z Frecuencia	Frecuencia de heterocigosidad	SNP ID
E1	P2P	g1040T>A	CCT-CCA	T/T 0.98	T/A 0.02	0.99	0.01	-	-
E4	V158M	g3634G>A	GTG-ATG	G/G 0.72	A/G 0.28	0.86	0.14	0.047	rs3729986
E4	G164G	g3654C>T	GGC-GGT	T/T 0.95	T/C 0.05	0.975	0.025	0.026	rs3218719
I4	IVS4-12insC	g3746-7insC		-/- 0.96	-/insC 0.04	0.98	0.02	0.491	rs11570050
E5	V189I	g3817G>A	GTC-ATC	G/G 0.96	G/A 0.04	0.98	0.02	0.012	rs11570052
E6	S236G	g5190A>G	AGC-GGC	A/A 0.87	A/G 0.13	0.935	0.065	0.126	rs3729989
E7	T262T	g5788C>T	ACC-ACT	C/C 0.81	C/T 0.09	0.955	0.045	0.110	rs11570058
E12	R326Q	g7360G>A	CGG-CAG	G/G 0.98	G/A 0.02	0.99	0.023	0.027	rs34580776
E23	L717L	g14971C>T	CTG-TTG	C/C 0.96	C/T 0.04	0.98	0.02	-	-
E23	V748V	g15066C>G	GTC-GTG	C/C 0.96	C/G 0.04	0.98	0.02	-	-
I23	IVS23+18C>G	g15148C>G		C/C 0.95	C/G 0.05	0.975	0.025	0.207	rs3729948
E25	R820Q	g16115G>A	CGG-CAG	G/G 0.99	G/A 0.01	0.995	0.008	ND	rs2856655
E25	V849V	g16203C>T	GTC-GTT	C/C 0.98	C/T 0.02	0.99	0.01	0.069	rs3729953
I26	IVS26+12C>T	g17784C>T		C/C 0.98	C/T 0.02	0.99	0.01	0.103	rs3729936
E30	E1096E	g20412G>A	GAA-GAG	A/A 0.80	A/G 0.20	0.90	0.1	0.49	rs1052373

Z: alelo mayoritario (que coincide con la secuencia de referencia), z: alelo minoritario, -: descrito en esta Tesis no aparece referencia en *GenBank database*

Las variantes IVS4-12insC y L717L forman parte de secuenciasceptoras de *splicing*, mientras que IVS23+18C>G y IVS26+12C>T forman parte de secuencias donadoras. Sin embargo, ninguna de estas variantes afecta al proceso de corte y empalme, según la predicción de los programas utilizados.

Todas las variantes se han identificado en controles sanos con una frecuencia >0.01, a excepción de R326Q y R820Q. La variante R326Q, identificada en tres de los casos índices, ha aparecido en un control sano de los 200 testados, lo que supone una frecuencia del 0.005. La variante R820Q se ha identificado en uno de los casos índice y en ninguno de los 200 controles sanos.

1.1.1.- Sensibilidad de las condiciones de optimización de la SSCP

Con el fin de testar la sensibilidad de las condiciones utilizadas, para llevar a cabo el cribado del gen *MyBPC3* en nuestra cohorte, se secuenció el exón 12 de las 130 muestras que la componen.

El resultado obtenido de la selección de moviidades anormales detectadas por SSCP y posterior confirmación por secuenciación determinó que tres de las muestras (casos índice de las familias H73, H126 y H175) tenían el polimorfismo R326Q y el caso índice de la familia H13 presentaba una deleción que provocaba un cambio en la pauta de lectura a partir del aminoácido 327 (Figura17).

El resultado de la secuenciación del exón 12 de las 130 muestras fue idéntico al encontrado por SSCP. Esto implica una sensibilidad de las condiciones de la SSCP, para el exón 12, del 100%.

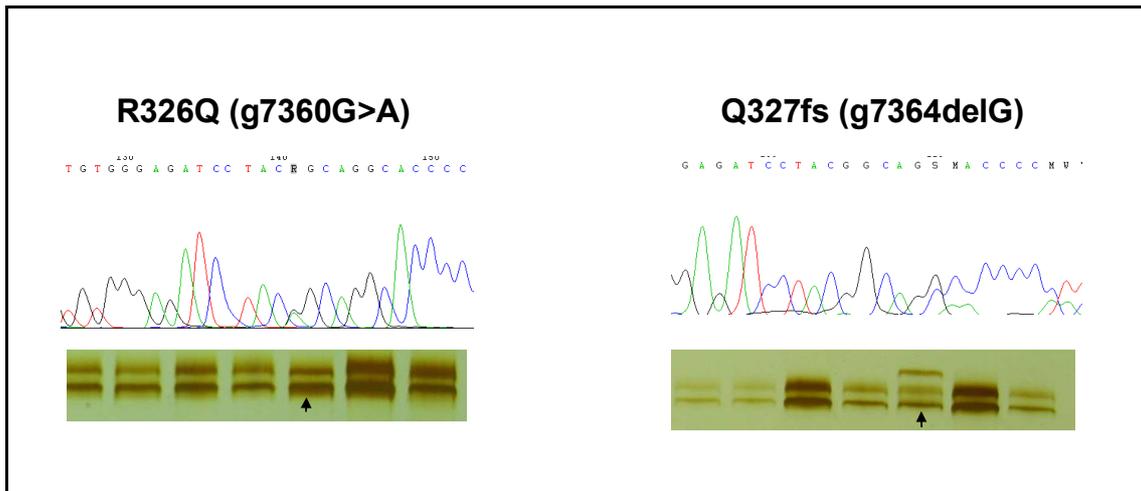


Figura 17: Electroferograma y patrón de bandas a pH 9.0-12°C para el polimorfismo R326Q y la mutación Q327fs.

1.2.- *Screening* de mutaciones conocidas por plataforma de genotipado SEQUENOM.

1.2.1.- Relación de mutaciones que se testan por la plataforma de genotipado.

El resultado de la búsqueda bibliográfica hasta el 2006 (Tablas 13 a 25) y las mutaciones que se identificaron en *MyBPC3* en el presente trabajo (Tabla 11) determinaron la relación de mutaciones testadas por la plataforma de genotipado. La localización de esas mutaciones en las respectivas secuencias genómicas fue necesaria para el diseño de los *primers*.

En las Tablas 13 a 25 se muestran las mutaciones encontradas en cada uno de estos genes y su localización en las respectivas secuencias genómicas de referencia:

Tabla 13: Mutaciones en MYH7

Secuencia de referencia: X52889.1 gi:29726 (18-APR-2005)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g4421-23 delGGG	G10del	g6330-32delAAG	K206del	g8803T>C	M388T
g4470C>T	A26V	g6333 A>C	K207Q	g8806G>A	G389E
g4508G>A	V39M	g6346C>T	P211L	g8817G>A	A393T
g4553C>T	R54X	g6460C>A	Q222K	g8823- 24insG,8851delG	L395- V404fs
g4554G>T	R54L	g6463G>A	A223T	g8823-24insG	L395fs
g4568G>A	V59I	g6475C>G	L227V	g8847C>T	R403W
g5038T>C	Y115H	g6491A>G	N232S	g8848G>A	R403Q
g5064G>A	IVS4+24G>A	g6526T>C	F244L	g8848G>T	R403L
g5353C>T	T124I	g6533G>A	IVS8+5G>A	g8849delG	V404X
g5409C>T	R143W	g6633A>C	K246Q	g8850G>A	V404M
g5409C>G	R143G	g6643G>A	R249Q	g8850G>T	V404L
g5410G>A	R143Q	g6664G>A	G256E	g8852delG	Val404fs
g5420G>T	K146N	g6685T>C	I263T	g8856G>A	V406M
g5425G>T	S148I	g6686A>G	I263M	g8860G>T	G407V
g5467A>G	Y162C	g7502T>G	F312C	g8871G>A	V411I
g6270G>C	V186L	g7525G>A	V320M	g8875C>A	T412N
g6275C>G	N187K	g7543G>C	A326P	g9039G>A	G425R
g6277C>A	T188N	g7550A>G	E328G	g9049C>T	A428V
g6283G>C	R190T	g8261T>C	M349T	g9055C>A	A430E
g6295A>C	Y194S	g8266A>G	K351E	g9070T>C	M435T
g6300G>A	A196T	g8278G>A	A355T	g9073T>A	F436Y
g6316T>C	I201T	g8789G>T	K383N	g9084G>A	V440M
g6325G>A	R204H	g8794C>T	A385V	g9091G>A	R442H

Tabla 13 (Continuación I): Mutaciones en *MYH7*

Secuencia de referencia: X52889.1 gi:29726 (18-APR-2005)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g9094T>C	I443T	g10352G>A	G571R	g12072C>T	R694C
g9114A>G	K450E	g10352G>C	G571R	g12073G>A	R694H
g9115A>C	K450T	g10368A>G	H576R	g12079A>G	N696S
g9123C>T	R453C	g10391 G>A	G584S	g12085T>C	V698A
g9124G>A	R453H	g10391G>C	G584R	g12127G>T	R712L
g9124G>T	R453L	g10401A>T	D587V	g12138G>A	G716R
g9483A>G	N479S	g10424-25delCAinsAG	Q595R	g12147C>T	R719W
g9494G>A	E483K	g10425A>G	Q595R	g12148G>A	R719Q
g9524A>C	M493L	g10442C>T	L601F	g12148G>C	R719P
g9525T>A	M493K	g10446A>G	N602S	g12307C>G	R723G
g9538G>T	E497D	g10457G>A	V606M	g12307C>T	R723C
g9542G>A	E499K	g10457G>C	V606L	g12325G>C	A729P
g9546A>C	E500A	g10474G>T	K611N	g12332C>T	P731L
g9548T>C	Y501H	g10484A>C	K615Q	g12338G>A	G733E
g9549A>G	Y501C	g10486G>C	K615N	g12340C>G	Q734E
g9578A>T	I511F	g10511T>A	Y624N	g12341A>C	Q734P
g9579T>C	I511T	g10845C>T	S642L	g12346A>G	I736V
g9585T>G	F513C	g10874A>G	R652G	g12347T>C	I736T
g9591T>G	M515R	g11271G>A	M659I	g12348T>G	I736M
g9596C>A	L517M	g11281C>A	R663S	g12361G>A	G741R
g10235T>C	S532P	g11281C>T	R663C	g12361G>C	G741R
g10245A>G	E535G	g11282G>A	R663H	g12361G>T	G741W
g10290C>T	A550V	g11305C>T	R671C	g12362G>C	G741A

Tabla 13 (Continuación II): Mutaciones en *MYH7*

Secuencia de referencia: X52889.1 gi:29726 (18-APR-2005)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g12365C>A	A742E	g13132G>A	V824I	g13988G>C	A901P
g12369G>C	E743D	g13198G>A	E846K	g13989C>G	A901G
g12697C>G	F764L	g13198G>C	E846Q	g14004A>G	D906G
g12703 G>C	K766N	g13201-03del	K847del	g14009C>G	L908V
g12707G>A	G768R	g13213T>C	S851P	g14012A>G	I909V
g12711T>C	L769P	g13217T>C	M852T	g14048G>A	E921K
g12726A>T	E774V	g13234-5delGCinsTG	A858C	g14057G>A	E924K
g12738A>G	D778G	g13234-5delGCinsCA	A858H	g14057G>C	E924Q
g12738A>T	D778V	g13267C>G	R869G	g14066G>A	E927K
g12739C>G	D778E	g13267C>T	R869C	g14069G>A	D928N
g12740G>T	E779X	g13268G>A	R869H	g14068-70delGGA	E927del
g12748- 50delGAGinsA GA	S782D	g13270C>T	R870C	g14078-80delGAG	E931del
g12749- 50delAGinsGA	S782D	g13271G>A	R870H	g14075G>A	E930K
g12750G>A	S782N	g13271G>T	R870L	g14078G>A	E931K
g12765G>A	R787H	g13292T>A	M877K	g14090G>A	E935K
g12791C>T	L796F	g13293G>T	M877I	g14144G>C	D953H
g12794G>A	A797T	g13295T>C	V878A	g14169T>G	L961R
g12794G>C	A797P	g13306C>G	Q882E	g14416T>C	M982T
g13084A>G	IVS21-2A>G	g13309-11del	E883del	g14527 C>A	T1019N
g13126A>C	M822L	g13317T>G	N885K	g14571G>A	IVS24+1G>A
g13126A>G	M822V	g13328T>A	L889H	g15812G>A	R1053Q
g13127T>C	M822T	g13334T>C	V891A	g15823G>A	G1057S
g13130G>A	G823E	g13968A>G	E894G	g15824G>A	G1057D

Tabla 13 (Continuación III): Mutaciones en *MYH7*

Secuencia de referencia: X52889.1 gi:29726 (18-APR-2005)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g17084G>A	G1101S	g20176G>T	K1459N	g21989-21991del	K1729del
g18078C>A	R1193S	g20222C>T	R1475C	g22007T>A	S1735T
g18153G>C	E1218Q	g20297C>T	R1500W	g22058G>A	E1751K
g18181A>T	E1227V	g20319G>A	IVS32+1G>A	g22216G>A	E1768K
g19073C>A	N1327K	g20454C>T	IVS32-25C>T	g22240A>G	S1776G
g19092C>T	Q1334X	g20497C>G	T1513S	g22243G>A	A1777T
g19132A>G	Y1347C	g21175G>A	E1555K	g22256G>A	R1781H
g19222C>T	T1377M	g21361-63delAAG	K1617del	g22447C>T	R1845W
g19227G>A	A1379T	g21412C>A	R1634S	g21412C>T	R1634C
g19236C>T	R1382W	g21671G>C	A1663P	g23612A>T	H1901L
g19874C>T	R1420W	g21752G>A	V1691M	g23696C>T	T1929M
g19892G>A	E1426K	g21798T>C	L1706P	g24227-41delGGC TTGAATGAGGAG	G1931- E1935del
g19974G>C	IVS31+5G>C	g21815C>T	R1712W		
g20159G>A	A1454T	g21816G>A	R1712Q		

Tabla 14: Mutaciones en *MyBPC3*

Secuencia de referencia: U91629.1 gi:2920822 (01-MAR-1998)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g1047G>A	G5R	g5257G>A	IVS6+1G>A	g10618delC	L448fs
g1104G>C	IVS1+45G>C	g5789G>A	G263R	g10628G>C	E451Q
g2176G>A	IVS1-1G>A	g5820G>A	R273H	g10713G>A	IVS15-1G>A
g2254C>T	R35W	g5824G>A	IVS7+1G>A	g10719-20delCC	P452fs
g2326A>G	T59A	g5824G>T	IVS7+1G>T	g10732C>T	T457M
g2331-41 delGGGCACA CGGC	E60fs	g5828G>A	IVS7+5G>A	g10735G>A	R458H
g2376-82 delCCAGGGA	D75fs	g5997C>T	IVS7-3C>T	g10771G>A	R470Q
g2377C>T	Q76X	g6011G>A	G278E	g10904G>A	IVS16-1G>A
g3117G>T	G115X	g6014G>C	G279A	g10915G>A	G490R
g3643C>T	P161S	g6022C>T	R282W	g10931G>A	R495Q
g3669T>G	IVS4+2T>G	g7308A>G	IVS11-2A>G	g10951C>T	R502W
g3707G>T	IVS4+40G>T	g7408T>A	V342D	g10952G>A	R502Q
g3781C>T	R177C	g7411delC	T343fs	g10957-59delAAG	K504del
g3876G>C	Q208H	g7421- 25dupCGGCA	M348fs	g11014G>T	G523W
g3901A>G	S217G	g7438T>C	L352P	g11038G>C	G531R
g5137A>C	IVS5-2A>C	g10102delC	H390fs	g11047-48delGC	A534fs
g5139G>A	V219L	g10385A>G	IVS13-6A>G	g11071G>C	E542Q
g5166G>A	D228N	g10491G>A	IVS14-13G>A	g11072G>C	IVS17+1G>C
g5194A>C	Y237S	g10512-13delTT	F412fs	g11073T>C	IVS17+2T>C
g5228C>A	D248E	g10523G>A	G416S	g11075A>T	IVS17+4A>T
g5250G>A	V256I	g10550C>T	Q425X	g11507-08delGT	V547fs
g5254A>C	H257P	g10587delT	V437fs	g11561A>T	K565X
g5256G>A	E258K	g10598G>A	E441K	g11564T>C	C566R

Tabla 14 (Continuación I): Mutaciones en *MyBPC3*

Secuencia de referencia: U91629.1 gi:2920822 (01-MAR-1998)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g11567-68delGA	E567fs	g15056A>G	D745G	g16183G>T	E843X
g11645delT	S593fs	g15069C>A	Y749X	g16190-94delGCGTC	R845fs
g11646delC	H594fs	g15069C>G	Y749X	g16197C>G	Y847X
g12415delA	K600fs	g15080-81insT	V753fs	g16198delG	A848fs
g12426A>T	D604V	g15087C>A	N755K	g16208C>T	A851V
g12428G>A	D605N	g15089delC	P756fs	g16209-12delCATC	A851fs
g12438C>T	P608L	g15091G>A	V757M	g16212delC	I852fs
g12495C>T	A627V	g15095G>A	G758D	g16213delG g16234-47 duplGCCTCCCA GCCCTT	G853fs A860fs
g12616A>G	IVS19-2A>G	g15130G>A	D770N	g17653C>A	P873H
g13858A>G	IVS20-2A>G	g15131G>A	IVS23+1G>A	g17705G>A	W890X
g13893G>A	R654H	g15131G>T	IVS23+1G>T	g17773-74delGT	IVS26+1delGT
g13935G>A	R668H	g15148C>T	IVS23+18C>T	g17773G>A	IVS26+1G>A
g13935G>C	R668P	g15853A>G	IVS23-2A>G	g18437C>G	IVS26-3C>G
g13945-48 del CCCTinsGG	V671fs	g15857G>A	V771M	g18485C>T	S928L
g13962C>T	P677L	g15920T>C	W792R	g18509C>T	T936M
g13980G>A	W683X	g15928delG	P794fs	g18529C>T	R943X
g14000G>A	IVS21+1G>A	g16085G>A	R810H	g18535-36delCG	R945fs
g14001T>G	IVS21+2T>G	g16088A>G	K811R	g18545A>C	N948T
g14243delC	IVS21-3delC	g16096-98 delAAG	K814del	g18566-67delCT	P955fs
g14274delC	P699fs	g16105C>G	R817G	g18575C>T	T958I
g14966C>T	IVS22-5C>T	g16111-15 delATGCG	M819fs	g18607C>T	Q969X
g15019C>T	R733C	g16147-48insT	H831fs	g18608G>A	IVS27+1G>A
g15042-63 dup	G740fs	g16156C>T	R834W		

Tabla 14 (Continuación II): Mutaciones en *MyBPC3*

Secuencia de referencia: U91629.1 gi:2920822 (01-MAR-1998)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g19753C>A	IVS28+27 C>A	g20410G>T	E1095X	g21034G>A	A1194T
g19906G>A	R1002Q	g20418G>A	W1098X	g21059delG	C1202fs
g19935C>T	Q1012X	g20456T>G	IVS30+2T>G	g21071G>A	G1206D
g19950G>A	E1017K	g20459G>C	IVS30+5G>C	g21082G>A	IVS32+1G>A
g19966G>C	R1022P	g20681T>A	F1113I	g21348-72del25nt	IVS32- 41del25nt
g19969-70insA	N1023fs	g20687G>A	V1115I	g21420- 23delins21404-15	D1220fs
g20082C>T	Q1061X	g20716C>A	C1124X	g21452- 53insTTCA	S1231fs
g20085-86 insGCAAG	V1062fs	g20717G>A	V1125M	g21458C>T	Q1233X
g20316-17insC	K1065fs	g20736T>C	I1131T	g21474T>C	L1238P
g20385G>T	K1087N	g20835G>A	IVS31+1G>A	g21524G>A	A1255T

Tabla 15: Mutaciones en *TNNT2*

Secuencia de referencia: NC_000001.9 gi:89161185 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g9466C>T	A28V	g12397G>T	K97N	g15283G>A	IVS11-1G>A
g12010C>T	S69F	g12417C>T	A104V	g15690G>T	R205L
g12012T>C	F70L	g12434T>C	F110L	g15704-06delAAG	K210del
g12034C>T	P77L	g12434T>A	F110I	g16351G>T	E244D
g12036A>G	K78E	g12434T>G	F110V	g18042G>A	D270N
g12040T>A	I79N	g12443A>T	R113W	g18051A>G	K273E
g12051G>A	E83K	g12478A>T>C	K124N	g18056G>A	IVS15+1G>A
g12057G>C	V85L	g13309C>T	R130C	g18433C>T	R278C
g12061A>C	D86A	g13312C>T	R131W	g18434G>C	R278P
g12380C>T	R92W	g13342C>T	R141W	g18457C>T	R286C
g12381G>T	R92L	g14299-301delGAG	E163del	g18458G>A	R286H
g12381G>A	R92Q	g14299G>A	E163K	g18461G>A	W287X
g12386C>T	R94C	g14326G>T	A172S		
g12387G>T	R94L	g14348C>T	S179F		

Tabla 16: Mutaciones en *TNNI3*

Secuencia de referencia: X90780.1 gi:4071059 (19-NOV-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g1254C>T	A2V	g4745G>C	R162P	g6478G>A	D196N
g1742C>T	R21C	g4757C>T	S166F	g6485T>C	L198P
g2530G>T	K58N	g4771G>A	A171T	g6487A>G	S199G
g2600C>T	P82S	g4792A>G	K178E	g6488G>A	S199N
g4649A>G	Q130R	g4807-09delAAG	K183del	g6497A>G	E202G
g4682G>A	R141Q	g4807A>G	K183E	g6499>6531del33nt	G203_X211del
g4691T>A	L144Q	g6449G>A	R186Q	g6499G>A	G203S
g4693C>G	R145G	g6460G>C	D190H	g6499G>C	G203R
g4693C>T	R145W	g6461A>G	D190G	g6502C>T	R204C
g4730C>T	A157V	g6467G>A	R192H	g6503G>A	R204H
g4745G>A	R162Q	g6477C>G	I195M	g6508A>C	K206Q

Tabla 17: Mutaciones en *TPMI*

Secuencia de referencia: NC_000015.8 gi:51511731 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g1392G>A	E40K	g1483A>C	K70T	g18277A>T	E180V
g1434G>A	E54K	g18253T>C	I172T	g18292T>G	L185R
g1458G>C	E62Q	g18261G>A	D175N	g19085G>A	E192K
g1462C>T	A63V	g18277A>G	E180G	g21495T>C	M281T

Tabla 18: Mutaciones en *MYL2*

Secuencia de referencia: Z15030.1 gi:37924 (14-NOV-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g2625G>A	A13T	g7490G>A	R57Q	g8629A>G	IVS5-2A>G
g2640T>C	F18L	g8459C>G	P94A	g10563G>C	IVS6-1G>C
g2652G>A	E22K	g8460C>G	P94R	g10658A>T	D165V
g6034C>A	N47K	g8486A>G	K103E		

Tabla 19: Mutaciones en *ACTC*

Secuencia de referencia: NC_000015.8 gi51511731 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g2263G>A	E101K	g4446G>T	A297S	g5203A>G	E363G
g3133C>G	P166A	g4476A>C	M307L		
g3140A>G	Y168C	g4498G>A	R314H		
g3458C>T	A232V	g5112G>C	A333P		

Tabla 20: Mutaciones en *TTN*

Secuencia de referencia: NC_000002.10 gi:89161199 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g5150G>A	V54M	g24443T>C	W930R	g69309G>A	S4417N
g21424G>T	R694L	g66675C>A	S3799Y	g231981-82insAT	I14499fs
g21433C>T	A743V	g67298C>T	Q4053X	g274717G>A	R25572Q

Tabla 21: Mutaciones en *MYL3*

Secuencia de referencia: NC_000003.10 gi:89161205 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g2626A>G	E56G	g3913G>A	E143K	g3947G>A	R154H
g2629C>G	A57G	g3931A>G	M149V	g3952G>A	V156M

Tabla 22: Mutaciones en *MYH6*

Secuencia de referencia: NC_000014.7 gi:51511730 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g11947G>A	R795Q	g14839G>T	A1004S	g20362G>A	E1457K
g14012C>T	P830L	g15308G>C	Q1065H		

Tabla 23: Mutaciones en *TNNC1*

Secuencia de referencia: NT_022517.17 gi:51464027(02-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g1821T>A	L29Q	g1912G>C>T	E59D	g2205G>T	D75Y
g2758G>A	G159D				

Tabla 24: Mutaciones en *TCAP*

Secuencia de referencia: NC_000017.9 gi:51511734 (03-MAR-2006)

Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g654G>C	E132Q	g670C>T	T137I	g718G>A	R153H

Tabla 25: Mutaciones en *MYLK2* y en *MYO6*

<i>MYLK2</i>		<i>MYO6</i>	
Secuencia de referencia: NC_000020.9 gi:51511747 (03-MAR-2006)		Secuencia de referencia: NC_000006.10 gi:89161210 (03-MAR-2006)	
Posición	Mutación	Posición	Mutación
g777C>A	A95E	g92034A>G	H246R

1.2.2.- Relación de mutaciones que no se testan por la plataforma de genotipado.

En el transcurso de la optimización y validación de la plataforma se determinó que había 20 mutaciones en las que el diseño no era posible, por lo que no entraron a formar parte de la plataforma (Tabla 26).

Tabla 26: Mutaciones de diseño no posible

GEN <i>MYH7</i>		GEN <i>MyBPC3</i>		GEN <i>TNNI3</i>	
Posición	Mutación	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g14001G>T	C905F	g17737-8insGCCT	L901fs	g4694G>A	R145Q
g14132G>A	E949K	g20096G>A	IVS29+5G>A	g4744C>T	R162W
g17905T>G	L1135R	g21078delC	P1208fs		
g19158G>A	E1356K	g21520-21 ins21503-20	G1248-C1253dup		
g12323C>T	A728V	g17724-33del	G897fs		
g12693T>G	V763G				
		GEN <i>TNNT2</i>		GEN <i>MYLK2</i>	
g13259C>A	S866Y	Posición	Mutación	Posición	Mutación
g20298G>C	R1500P	g18046A>T	N271I	g753C>T	A87V
g21284T>A	L1591Q	g18051A>G	K273E		
g8808C>G	L390V				

Finalmente, la plataforma quedó configurada con 560 mutaciones, pertenecientes a 14 genes sarcoméricos (*MYH7*, *MyBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *ACTC*, *TTN*, *MYL3*, *MYH6*, *TNNC1*, *TCAP*, *MYLK2*, *MYO6*) y asociadas con MCH (Tabla 27).

Tabla 27: Número de mutaciones testadas con la plataforma de genotipado rápido

GEN	Nº MUTACIONES	GEN	Nº MUTACIONES
<i>MYH7</i>	247	<i>TTN</i>	9
<i>MyBPC3</i>	179	<i>MYL3</i>	6
<i>TNNT2</i>	40	<i>MYH6</i>	5
<i>TNNI3</i>	33	<i>TNNC1</i>	4
<i>TPM1</i>	12	<i>TCAP</i>	3
<i>MYL2</i>	11	<i>MYLK2</i>	1
<i>ACTC</i>	9	<i>MYO6</i>	1
TOTAL DE MUTACIONES TESTADAS		560	

1.2.3.- Sensibilidad de la plataforma

Se utilizaron los 130 casos índice de la presente Tesis Doctoral para testar la sensibilidad de la plataforma de genotipado. Todos los resultados positivos obtenidos por plataforma se confirmaron por secuenciación. La mutación IVS29+5G>A no se pudo testar, puesto que el diseño del ensayo no fue posible para ella (Tabla 26).

Todas las mutaciones que se habían identificado, en esta cohorte, para *MYH7*: M388T, R663H, I736T, G768R, R787H, A797P, A797T, R870H y K1459N (Laredo y cols., 2006 y datos no publicados del laboratorio) se confirmaron, mientras que, en el caso de *MyBPC3* (resultados apartado 1.1) se detectó un falso negativo en la mutación R1022P (familia H18) y tres falsos positivos para dos mutaciones: E451Q (familias H18 y H81) y R733C (familia H122). Estos resultados se traducen en una sensibilidad y una especificidad de la plataforma de genotipado rápido de más del 96%.

Tabla 28: Sensibilidad, especificidad, valor predictivo y eficiencia de la plataforma de genotipado rápido para los genes *MYH7* y *MyBPC3*

		Portador*	No portador*	Total
Resultados Plataforma	Genotipo +	30	3	33
	Genotipo –	1	96	97
	Total	31	99	130

* Como resultado del *screening* por SSCP, de los genes *MYH7* y *MyBPC3*, en las 130 muestras de la cohorte se identificaron 31 portadores de mutación y 99 casos índice sin mutación. Todos estos resultados fueron confirmados por secuenciación.

Teniendo en cuenta estos valores podemos calcular:

- 1) Sensibilidad = $[\text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})]*100 = 30/31*100 = 96.78\%$
- 2) Especificidad = $[\text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})]*100 = 96/99*100 = 96.97\%$
- 3) Valor predictivo positivo = $[\text{VP}/(\text{VP}+\text{FP})]*100 = 30/33*100 = 90.91\%$
- 4) Valor predictivo negativo = $[\text{VN}/(\text{VN}+\text{FN})]*100 = 96/97*100 = 98.97\%$
- 5) Eficiencia = $(\text{VP}+\text{VN})/\text{TOTAL} = (30+96)/130 = 96.95\%$

VP: verdadero positivo, VN: verdadero negativo, FP: falso positivo, FN: falso negativo

En ninguno de los casos índice se identificó alguna mutación adicional, en *MYH7* o *MyBPC3*, que no hubiera sido ya identificada utilizando el cribado con SSCP y posterior secuenciación de los fragmentos con movilidad anormal.

1.2.4.- Evaluación de la presencia de mutaciones conocidas en otros genes sarcoméricos (*TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TPMI*, *ACTC*, *TTN*, *MYL2*, *MYL3*, *MYH6*, *TCAP*, *MYO6* y *MYLK2*).

El *screening* de mutaciones en los 12 genes sarcoméricos restantes, de estos 130 casos índices, resultó negativo cuando se pasaron las muestras por la plataforma, pues no se identificó ninguna mutación de las previamente descritas en estos genes.

2.- Análisis clínicos de la cohorte

En la Tabla 29 se resumen las características de los casos índice agrupados en tres grupos: pacientes con mutación en *MyBPC3*, pacientes con mutación en *MYH7* y pacientes sin mutación en ninguno de los dos genes (*MYH7/MyBPC3*). No hubo diferencias en la edad de diagnóstico, el sexo, presencia de hipertensión arterial (HTA), antecedentes de MCH o MS. Tampoco en los síntomas, tratamiento médico o intervenciones realizadas.

La comparación entre los pacientes sin mutación y los que tienen mutación en *MyBPC3* determinó diferencias significativas en el grosor parietal máximo, con mayor grado de hipertrofia en los pacientes con mutación en el gen *MyBPC3* ($p=0.034$); sin embargo esta variable pierde significación estadística cuando se ajusta a la superficie corporal ($p=0.077$). Además el 31% de los pacientes con mutación en *MyBPC3* tuvieron respuesta anormal de presión arterial en la prueba de esfuerzo ($p=0.032$).

Cuando se compararon los pacientes con mutación en el gen *MyBPC3* con aquellos mutados en *MYH7* procedentes de la misma cohorte de pacientes, se observó mayor grado de hipertrofia, si se ajustaba el grosor parietal máximo con la superficie corporal ($p=0.004$), en aquellos casos índice con mutación en el gen *MYH7*.

Al comparar los pacientes con mutación en uno de los dos genes con los no portadores, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad en que se empezaban a seguir los pacientes, en la respuesta anormal a la presión arterial durante la prueba de esfuerzo, en el grado de hipertrofia y en el tamaño de la aurícula izquierda. Los casos índice con mutación se empezaban a seguir a edades más tempranas ($p=0.049$), tenían con mayor frecuencia, respuesta anormal a la presión arterial durante la prueba de esfuerzo ($p=0.030$), mayor grado de hipertrofia ($p=0.001$) y tamaño de la aurícula izquierda ($p=0.038$). Además, los casos índice con mutación presentaban con mayor frecuencia antecedentes familiares de MCH y/o MS y taquicardia ventricular no sostenida, aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa.

Tabla 29: Características fenotípicas de los casos índice con en *MYH7*, *MyBPC3* y sin mutación en ninguno de estos dos genes

	Sin mutación (n=97)	Mutation <i>MyBPC3</i> (n=20)	Mutation <i>MYH7</i> (n=11)	P (<i>MyBPC3</i> vs. sin mutación)	P (<i>MyBPC3</i> vs. <i>MYH7</i>)	P (con vs. sin mutación)
Edad diagnóstico (años)	53 (16)	46 (16)	44 (19)	0.99	0.97	0.051
Edad inicio seguimiento (años)	56 (16)	49(15)	50 (18)	0.11	0.86	0.049
Sexo masculino	68%	55%	38%	0.30	0.46	0.054
Antecedentes familiares MCH	23%	30%	62%	0.56	0.25	0.10
Antecedentes familiares MS	16%	15%	31%	1	0.21	0.42
HTA	43%	40%	23%	1	1	0.42
NYHA inicial III-IV	10.5%	10%	8%	1	0.60	0.74
NYHA III-IV en alguna ocasión	38%	50%	46%	0.32	1	0.21
Angina	60%	70%	41%	0.45	0.45	0.68
Síncope	19%	15%	27%	1	0.64	1
TV no sostenida	25.3%	42.1%	40%	0.16	1	0.10
Respuesta anormal PA	10.8%	31.6%	67%	0.032	0.9	0.030
Grosor máximo (mm)	22 (6)	25 (7)	27 (8)	0.034	0.16	0.001
Grosor máximo ≥ 30 mm	13%	15%	39%	0.73	0.95	0.09
Grosor máximo/SC (mm/m2)	12.08 (3.3)	13.54 (3.5)	18.02 (4.4)	0.077	0.004	<0.01
Fracción acortamiento (%)	39 (10)	39 (11)	43 (10)	0.79	0.29	0.67
Aurícula izquierda (mm)	45 (7)	50 (11)	50 (14)	0.098	0.79	0.038
Gradiente ≥ 30 mmHg	29%	35%	31%	0.60	1	0.89

HTA: hipertensión arterial; MCH: miocardiopatía hipertrófica; MS: muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; PA: presión arterial; TV: taquicardia ventricular.

3.- Estudios bioinformáticos

3.1.- Conservación y alineamientos entre especies de las mutaciones y sus regiones flanqueantes.

Se compararon las secuencias nucleotídicas implicadas en las mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral con siete especies de mamíferos (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Alignments).

Los nucleótidos mutados estaban altamente conservados en las siete especies para las mutaciones D75N, IVS6+5G>A, Q327fs, V471E, R502Q, K504del, E542Q, R1022P, IVS29+5G>A y E1179K). En el resto de las mutaciones identificadas (A216T, IVS11-9G>A, R495W, K600fs, P955fs y T957S) los nucleótidos estaban conservados en al menos cinco de las especies (Figura 18). Esto se traduce en aminoácidos conservados, en las siete especies, en todas las posiciones donde se produjeron las mutaciones exónicas, con la excepción de las A216 y T957 que estaban conservadas en cinco de las siete especies.

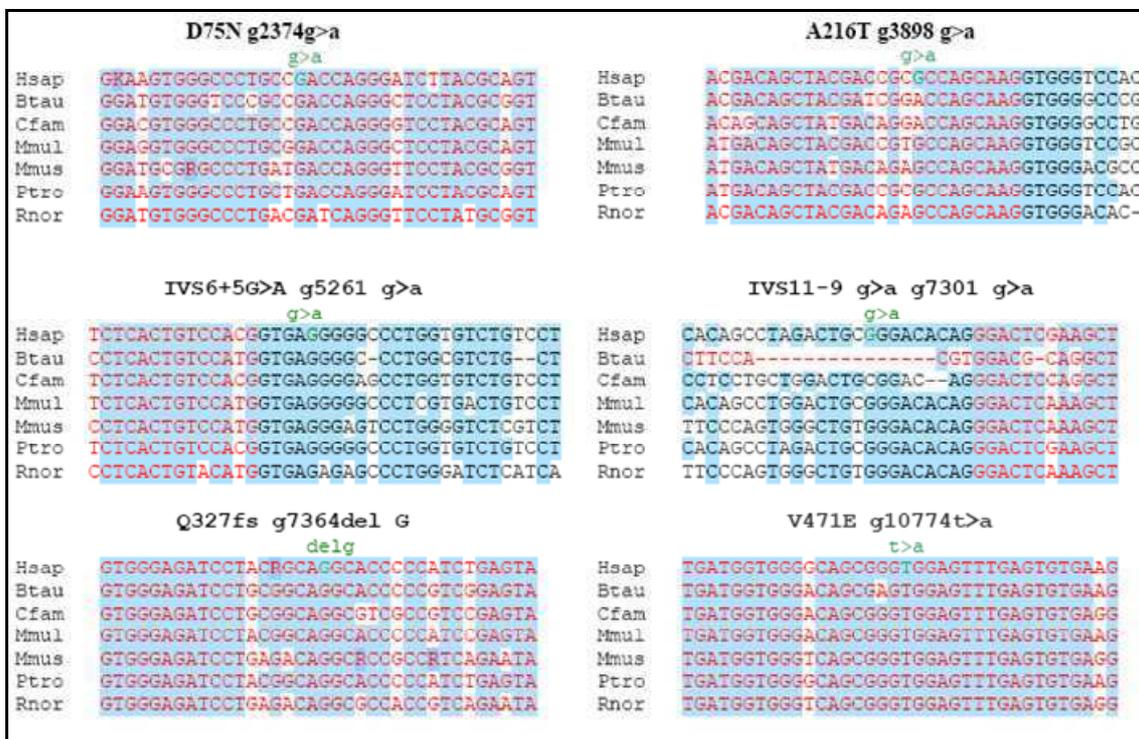


Figura 18: Comparación de las regiones implicadas en mutación, entre especies de mamíferos: *Homo sapiens* (Hsap), *Bos taurus* (Btau), *Canis familiares* (Cfam), *Macaca mulatta* (Mmul), *Mus musculus* (Mmus), *Pan troglodytes* (Ptro), *Rattus norvegicus* (Rnor). El fondo azul indica nucleótidos conservados. Los nucleótidos en negrita pertenecen al exón y los rojos a región intrínica. Los nucleótidos donde se produce la mutación aparecen en verde. www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Alignments

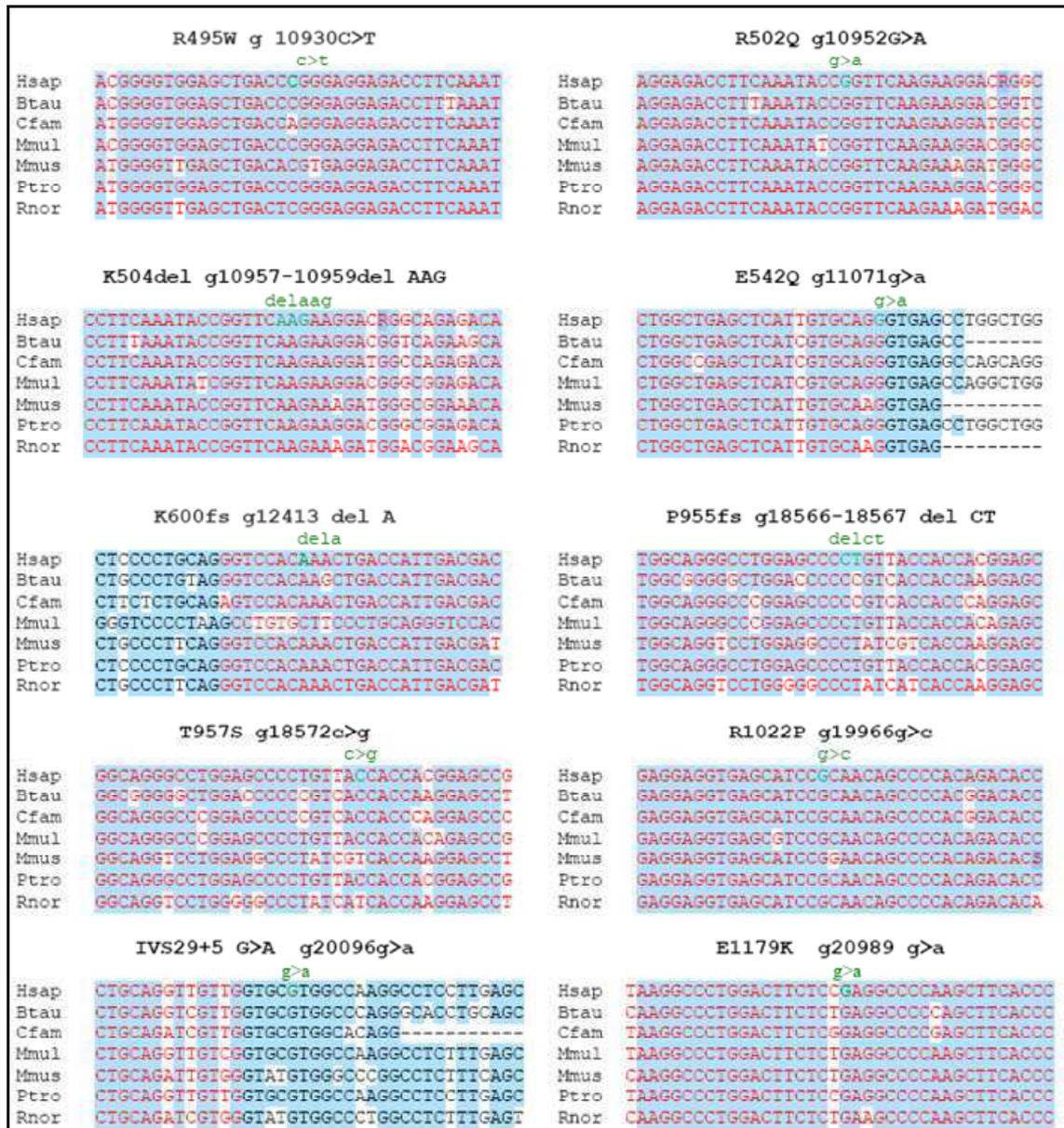


Figura 18 (continuación): Comparación de las regiones implicadas en mutación, entre especies de mamíferos: *Homo sapiens* (Hsap), *Bos taurus* (Btau), *Canis familiares* (Cfam), *Macaca mulatta* (Mmul), *Mus musculus* (Mmus), *Pan troglodytes* (Ptro), *Rattus norvegicus* (Rnor). El fondo azul indica nucleótidos conservados. Los nucleótidos en negrita pertenecen al exón y los rojos a región intrónica. Los nucleótidos donde se produce la mutación aparecen en verde.
www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compare_Alignments

3.2.- Alineamientos entre isoformas de proteínas C de unión a la miosina

Se alinearon y compararon las secuencias aminoacídicas de las tres isoformas de proteína C de unión a miosina en las regiones donde se habían identificado las mutaciones exónicas en el gen *MyBPC3* mediante el software ClustalW (<http://services.uniprot.org/clustalw/clustalw2>). En la Figura 19 se muestran los

alineamientos de este tipo de mutaciones, a excepción de la mutación D75N que está localizada en un motivo específico de la isoforma cardiaca.

Todas las mutaciones estaban localizadas en aminoácidos conservados, al menos, entre la isoforma C2 (de contracción rápida) y la isoforma C3 (cardiaca); con la excepción de Q327fs. Esta última está localizada en el motivo *S2-binding*, dominio que no muestra tanta homología entre isoformas, y cerca de una secuencia específica de la isoforma cardiaca (LAGGRRIS), localizada entre los aminoácidos 276 al 284.

<p>Localización: Motivo C1 Mutación: A216T</p> <p style="text-align: center;">A/T</p> <p>MyBPC3 KWFKGGKVVLDLSSKVGQHLQLHDSYDRASKVYLE MyBPC2 -----LE-G--S-ARFSFKE-HNS--N--TV MyBPC1 -----M-A--A-K---KETFE-H-R-T</p>	<p>Localización: Motivo <i>S2 binding</i> Mutación: Q327fs</p> <p style="text-align: center;">frameshift</p> <p>MyBPC3 LEAP AEEDVWEILRQAPPSEYERIAFYQYGV MyBPC2 KKDDDDLGPPEI--L-KG-KK---K-----I MyBPC1 Q V---L-KN-K---K-----I</p>
<p>Localización: Motivo C3 Mutación: V471E</p> <p style="text-align: center;">V/E</p> <p>MyBPC3 TRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQVKW MyBPC2 VT-----Q-F--D--MAV-----M- MyBPC1 -KQ---TTAYC-E---L-----DD-N---</p>	<p>Localización: Motivo C3 Mutación: R495W</p> <p style="text-align: center;">R/W</p> <p>MyBPC3 EGAQVKWLKDGVELTREETFK YRFKKDQQRH MyBPC2 ---M-M-N-----DS--AR---K--- MyBPC1 DD-N---F-NGE-IIPGPKSR ---IRVE-KK-</p>
<p>Localización: Motivo C3 Mutaciones: R502Q; K504del</p> <p style="text-align: center;">R/Q; Kdel</p> <p>MyBPC3 KDGVELTREETFK YRFKKDQQRHLLIINEA MyBPC2 -----DSFKAR-----K--I--FSDV MyBPC1 -N-E-IIPGPKSR --IRVE-KK-I---EG-</p>	<p>Localización: Motivo C3 Mutación: E542Q</p> <p style="text-align: center;">E/Q</p> <p>MyBPC3 ALCTSGGQALAEILVQEKKLEVYQSIADLMVGAK MyBPC2 QVI-N---CE-----E-Q---L-D---T-K-S MyBPC1 SVM-T---SS-K-S-DL-P-KILTPLTQT-NLG</p>
<p>Localización: Motivo C4 Mutación: K600fs</p> <p style="text-align: center;">frameshift</p> <p>MyBPC3 DSRIKVSHIGRVHKLTIIDVTPADEADYSFVPEG MyBPC2 SK--TI--V--F--V--R-E--G--T--D-- MyBPC1 SD-L-V-K-I--V-ANALTE--G-V-A-DA</p>	<p>Localización: Motivo C7 Mutación: P955fs;T957S</p> <p style="text-align: center;">Frameshift; T/S</p> <p>MyBPC3 PTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTTTEPVTQVEI MyBPC2 -----I---VGV-I--RSE-A-LAQ---IR-- MyBPC1 --D-KIFV--K-V-A--ASE-KYSQ-IL-K--</p>
<p>Localización: Motivo C8 Mutación: R1022P</p> <p style="text-align: center;">R/P</p> <p>MyBPC3 GKPRPQVWTKEGQPLAGEEVSIRNSPTDILFI MyBPC2 -----V---G-A--DTSR-HV-T-DF--VF-V MyBPC1 -----EL--K-D-AEIDKNQIN---E---I--</p>	<p>Localización: <i>Linker</i> C9-C10 Mutación: E1179K</p> <p style="text-align: center;">E/K</p> <p>MyBPC3 PGITYEPPNYKALDFSEAPSFQTPLVNRSVIAGY MyBPC2 T---FK-FE--EH--RM--K-LT--ID-V-V MyBPC1 D-KI-KN-V-EDF-----M-----TYA---</p>

Figura 19: Alineamiento de las tres isoformas de MyBP-C. *MyBPC3*, *MyBPC2* y *MyBPC1* son los nombres de los genes que codifican para las isoformas cardiaca, esquelética de contracción rápida y esquelética de contracción lenta, respectivamente. Se muestran las secuencias aminoacídicas que flanquean a las mutaciones identificadas en las regiones exónicas, a excepción de D75N. Los guiones indican aminoácidos iguales entre isoformas. El fondo azul indica aminoácidos conservados, al menos, en dos de las isoformas. Los aminoácidos donde se producen las mutaciones aparecen en rojo.

3.3.- Comparación de la conservación de aminoácidos de la c-MyBPC entre especies e isoformas

Se compararon los resultados obtenidos de los alineamientos de la c-MyBPC entre especies con los resultados del alineamiento entre las tres isoformas de la MyBP-C humana.

Los aminoácidos V471, R502, K600, P955, R1022 son aminoácidos altamente conservados entre especies de mamíferos y entre las tres isoformas de la MyBP-C. Los aminoácidos R495, K504, E542 y E1179 son aminoácidos altamente conservados entre especies y además están conservados en dos de las tres isoformas de MyBP-C. Los aminoácidos A216T y T957 están conservados en los dos tipos de alineamiento.

El aminoácido Q327 está muy conservado entre las isoformas cardiacas de diferentes especies y no lo está en las otras isoformas.

Tabla 30: Conservación de los aminoácidos implicados en mutaciones exónicas. Comparación entre especies e isoformas de MyBP-C.

Localización en cMyBP-C	Conservación entre mamíferos	Conservación entre isoformas de MyBP-C
D75	Fondo azul oscuro	Fondo negro
A216	Fondo azul claro	Fondo azul claro
Q327	Fondo azul oscuro	Fondo blanco
V471	Fondo azul oscuro	Fondo azul oscuro
R495	Fondo azul oscuro	Fondo azul claro
R502	Fondo azul oscuro	Fondo azul oscuro
K504	Fondo azul oscuro	Fondo azul claro
E542	Fondo azul oscuro	Fondo azul claro
K600	Fondo azul oscuro	Fondo azul oscuro
P955	Fondo azul oscuro	Fondo azul oscuro
T957	Fondo azul claro	Fondo azul claro
R1022	Fondo azul oscuro	Fondo azul oscuro
E1179	Fondo azul oscuro	Fondo azul claro

Fondo azul oscuro: Aminoácido muy conservado: El aminoácido está conservado en al menos seis de las siete especies de mamífero o en las tres isoformas de MyBP-C comparadas.

Fondo azul claro: Aminoácido conservado: el aminoácido está conservado en cinco de las siete especies que se compararon o en dos de las tres isoformas de MyBP-C.

Fondo blanco: Aminoácido no conservado.

Fondo negro: No se puede comparar. Se encuentra en un dominio cardioespecifico.

Especies de mamíferos comparadas: *Homo sapiens* (Hsap), *Bos taurus* (Btau), *Canis familiares* (Cfam), *Macaca mulatta* (Mmul), *Mus musculus* (Mmus), *Pan troglodytes* (Ptro), *Rattus norvegicus* (Rnor).

Isoformas de MyBP_C: c-MyBPC y las dos isoformas esqueléticas (de contracción rápida y de contracción lenta)

3.4.- Análisis bioinformático de mutaciones con cambio de sentido.

3.4.1.- Propiedades físico-químicas de los aminoácidos implicados en las mutaciones de cambio de sentido

Se estudiaron las principales propiedades físico-químicas de los aminoácidos. La Tabla 31 muestra los cambios en la carga, masa e hidrofobicidad de los aminoácidos en que se han producido mutaciones *missense*. En la Figura 20 se representan las mutaciones que suponen cambios en la hidrofobicidad de la región flanqueante.

Tabla 31: Cambios experimentados por las mutaciones *missense* en la carga, masa e hidrofobicidad

Motivo	Mutación <i>Missense</i>	Cambio en la carga del aminoácido		ΔM_m (UMA)	Hidrofobicidad (Kyte & Doolittle)	
		salvaje	mutado		Aa salvaje	Aa mutado
C0	D75N	Polar (+) ácido	Polar no cargado (gr amida)	-1	-3.5	-3.5
C1	A216T	No polar	Polar no cargado (gr. Hidrox)	30	1.8	-0.7
C3	V471E	No polar	Polar (+) ácido	30	4.2	-3.5
C3	R495W	Polar (+) básico	No polar	30	-4.5	-0.9
C3	R502Q	Polar (+) básico	Polar no cargado (gr. Amida)	-28	-4.5	-3.5
C3	E542Q	Polar (+) ácido	Polar no cargado (gr. Amida)	-1	-3.5	-3.5
C7	T957S	Polar no cargado (gr. Hidrox.)	Polar no cargado (gr. Hidrox)	-14	-0.7	-0.8
C8	R1022P	Polar (+) básico	No polar	-59	-4.5	-1.6
<i>Linker</i> C9-C10	E1179K	Polar (+) ácido	Polar (+) básico	-1	-3.5	-3.9

ΔM_m : incremento de masa molecular;

Escala Kyte & Doolittle (-4.5, 4.5): Regiones con valores por encima de 0 son hidrofóbicas.

Datos recogidos en <http://prowl.rockefeller.edu/aainfo/mutation.html>.

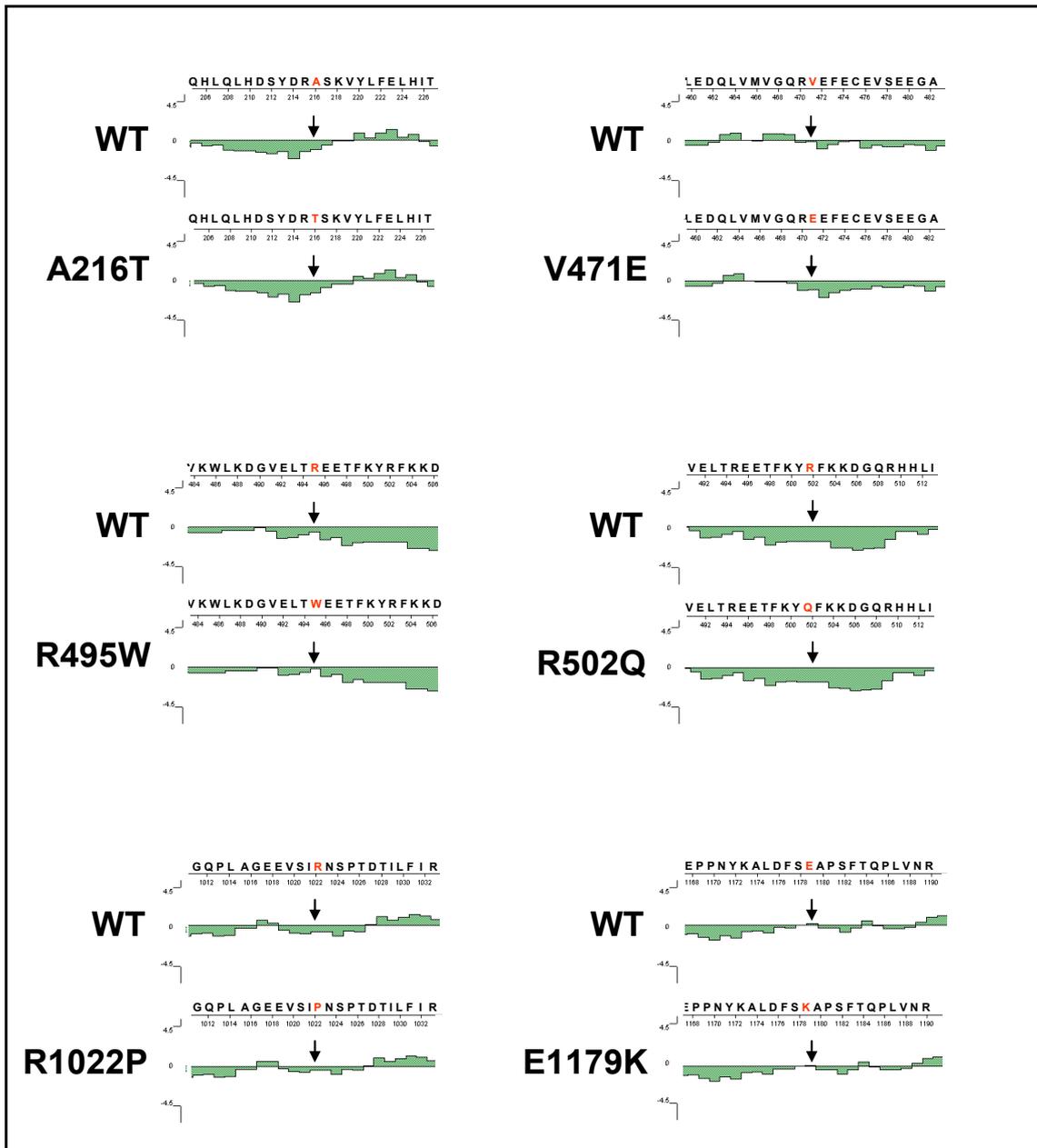


Figura 20: Variación en la hidrofobicidad en residuos mutados. Datos obtenidos en <http://www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-protean.aspx>. Escala -4.5 a 4.5

3.4.1.1.- Mutaciones *missense* sobre aminoácidos polares

En este estudio, de las nueve mutaciones de cambio de sentido identificadas, siete de ellas (D75N, R495W, R502Q, E542Q, T957S, R1022P y E1179K) se localizaron en aminoácidos polares. Debido a sus cadenas laterales, estos aminoácidos pueden formar puentes de hidrógeno con el agua y por su naturaleza hidrofílica tienden a ubicarse en la región externa de la molécula de la proteína.

Los cambios identificados en aminoácidos polares ácidos no supusieron cambio de masa, de hidrofobicidad ni de polaridad, aunque sí de carga. En el caso de las mutaciones D75N y E542Q se sustituyó un aminoácido polar ácido por uno polar neutro, y en E1179K se hizo por uno polar básico (Tabla 31).

Además, se identificaron tres mutaciones sobre aminoácidos polares básicos (R495W, R502Q, R1022P). Aunque el cambio identificado en la arginina 502 a glutamina supuso un descenso considerable de masa, cambio de carga: de positivo a no cargado, y aumento de hidrofobicidad, el aminoácido mutado continúa siendo polar y muy hidrofílico (Figura 20). Sin embargo, los cambios identificados en los aminoácidos R495 y R1022 supusieron la pérdida de la polaridad en esa posición, con el consecuente aumento de hidrofobicidad (Figura 20). El cambio de masa fue también considerable: aumentando en la posición 495 y disminuyendo considerablemente en la posición 1022 (Tabla 31).

Una de las mutaciones se produjo sobre un aminoácido polar no cargado (T957S). El cambio de treonina a serina supuso pérdida de masa, variación muy pequeña en la hidrofobicidad, y ningún cambio en la polaridad ni en la carga (Tabla 31).

3.4.1.2.- Mutaciones *missense* sobre aminoácidos no polares

Se identificaron dos mutaciones en aminoácidos no polares (A216T y V471E), esto es, aminoácidos que poseen cadenas laterales hidrofóbicas (cadenas carbonadas simples) que no interactúan con el agua y que por lo tanto, se localizan en el interior de la molécula de la proteína de la cual forman parte.

Los cambios identificados en estas dos posiciones (aminoácidos 216 y 471) supusieron un aumento considerable de masa y pérdida de hidrofobicidad, sobre todo en el caso del aminoácido 471 (Figura 20). En el caso de la mutación V471E se produjo un cambio de un aminoácido no polar (que se localiza en el interior de la molécula) a un aminoácido ácido que siempre está cargado negativamente en la célula, es muy hidrofílico y se localiza en la superficie de las proteínas.

3.4.2.- Impacto potencial de la sustitución de un aminoácido por otro

El análisis *in silico* realizado para predecir el posible impacto de la sustitución de un aminoácido por otro, sobre la estructura y función la proteína, determinó cambios benignos o neutrales en cuatro de las mutaciones: A216T, E542Q, T957S y E1179K, mientras que en las cinco mutaciones restantes: D75N, V471E, R495W, R502Q, R1022P no hubo unanimidad en las predicciones. En estas cinco mutaciones las predicciones resultaron patológicas para dos de ellos (Tabla 32).

Los programas Polyphen y SIFT predijeron, con *scores* altos, que los cambios identificados en D75 y V471 eran perjudiciales o afectaban a la función, respectivamente. Mientras que la predicción del programa PMut determinó que los cambios eran neutrales, aunque la fiabilidad de estas predicciones no fue alta (F=3 y F=5).

La predicción obtenida de los programas Polyphen y PMut para valorar el efecto de la sustitución de R495 por W495 fue probablemente perjudicial o patológica, respectivamente y los *scores* fueron altos en ambos casos. Y aunque el programa SIFT predijo el cambio como tolerado, lo hizo con un *score* bajo.

Por otro lado, SIFT predijo, con un *score* alto, que la mutación R502Q era un cambio tolerado. Mientras que la predicción de Polyphen y PMut fue de posiblemente perjudicial (supone que afecta a la función y a la estructura de la proteína) y patológico (con fiabilidad baja), respectivamente.

Por último, SIFT predijo, con un *score* no demasiado alto, que la sustitución de una R por un P en el residuo 1022 era tolerada. Mientras que Polyphen y PMut dieron un resultado de probablemente perjudicial (afecta a la función y a la estructura de la proteína con alta confianza) y patológico (con fiabilidad baja), respectivamente.

Tabla 32: Impacto potencial de la sustitución de un aminoácido según tres predictores bioinformáticos

Mutación	Polyphen		PMut			SIFT	
	Predicción	*PSIC <i>score</i> difference	Predicción	* <i>Score</i> (NN output)	Fiabilidad	Predicción	* <i>Score</i>
D75N	Posiblemente perjudicial	1.614	neutral	0.3396	3	Función afectada	0.01
A216T	Benigno	0.001	neutral	0.2071	5	Tolerada	0.55
V471E	Probablemente perjudicial	2.109	neutral	0.2061	5	Función afectada	0.00
R495W	Probablemente perjudicial	2.223	patológico	0.9479	8	Tolerada	0.12
R502Q	Posiblemente perjudicial	1.818	patológico	0.6012	2	Tolerada	0.54
E542Q	Benigno	1.408	neutral	0.0408	9	Tolerada	0.38
T957S	Benigno	0.850	neutral	0.0478	9	Tolerada	0.73
R1022P	Probablemente perjudicial	2.688	patológico	0.6953	3	Tolerada	0.25
E1179K	Benigno	1.424	neutral	0.2923	4	Tolerada	0.34

*El significado de los *scores* aparece en el apartado 4.2.2 de material y métodos

3.4.3.- Predicción de estructura secundaria (servidor GOR V)

El análisis computacional de la estructura de la proteína predijo cambios en la composición de α -hélices y láminas β , únicamente, para las mutaciones A216T y V471E, con respecto a las secuencias salvajes (Tabla 33).

Tabla 33: Predicción del cambio en la estructura secundaria (programa GOR V)

Nº Aminoácido	Salvaje>Mutado	p(H)	p(E)	p(C)	Predicción
75	D>N	0.137>0.117	0.168>0.172	0.695>0.710	C>C
216	A>T	0.415>0.392	0.211>0.217	0.374>0.391	H>C
471	V>E	0.355>0.557	0.441>0.194	0.204>0.250	E>H
495	R>W	0.527>0.511	0.205>0.216	0.268>0.273	H>H
502	R>Q	0.414>0.419	0.333>0.334	0.252>0.247	H>H
542	E>Q	0.625>0.658	0.198>0.183	0.177>0.158	H>H
957	T>S	0.104>0.107	0.466>0.444	0.430>0.449	C>C
1022	R>P	0.124>0.071	0.405>0.251	0.471>0.678	C>C
1179	E>K	0.152>0.150	0.238>0.237	0.610>0.613	C>C

H: hélice α , E: Beta-lámina, C: coil
p(H): Probabilidad de hélice α ; p(E): Probabilidad de Beta-lámina; p(C): Probabilidad de coil

3.5.- Análisis bioinformático de mutaciones que causan un cambio en la pauta de lectura de ARNm. Predicción de los efectos de las deleciones a nivel de transcripción y traducción.

La mutación Q327fs produjo un cambio de pauta en la lectura que según el BLAST desencadena un truncamiento de la proteína 22 residuos después, en el aminoácido 349.

La deleción *in frame* K504del, no causó un cambio en la secuencia de aminoácidos y dio lugar, según el BLAST, a una proteína con un aminoácido menos, con respecto a la proteína salvaje.

La mutación K600fs produjo un cambio de pauta en la lectura de los aminoácidos que se estimó, mediante BLAST, que desencadenaba un truncamiento de la proteína en el aminoácido 601.

La mutación P955fs creó un cambio de pauta en la lectura que daba lugar a un truncamiento de la proteína al final del exón 29, según el alineamiento que se hizo mediante BLAST (Tabla 34).

Tabla 34: Efecto y localización de las deleciones identificadas en los exones

INTERACCIÓN CON	LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	POSIBLE EFECTO	
			Tránsito	Traducción
S2 de miosina	S2 <i>binding</i>	Q327fs	<i>Frameshift</i>	Truncamiento
Se desconoce	C3	K504del	<i>In frame</i>	Un aa menos
Se desconoce	C4	K600fs	<i>Frameshift</i>	Truncamiento
Interacción con C10 de MyBPC3. En C10 unión con titina y miosina	C7	P954fs	<i>Frameshift</i>	Truncamiento

3.6.- Análisis bioinformático de mutaciones que afectan al *splicing*: las secuencias donadoras y aceptoras de *splicing*.

Se realizó el análisis *in silico*, de las tres mutaciones identificadas en las regiones intrónicas flanqueantes a las secuencias codificantes, mediante 5 programas bioinformáticos que predicen sitios de corte-empalme (NNSplice, SSF, ASSP, NetGene2 y HSF). Dos de las mutaciones afectaban a un sitio donador de *splicing* (IVS6+5G>A y IVS29+5G>A) y una a un sitio aceptor (IVS11-9G>A) (Tabla 35).

La mutación IVS6+5G>A mostró cambios en todas las predicciones, disminuyendo sensiblemente el *score* del donador mutado o incluso no pudiendo ser identificado por el predictor (NNSplice y ASSP).

Los programas NNSplice y ASSP no identificaron a los donadores salvaje y mutante del intrón 29. El donador mutante fue identificado con menos *score* que el salvaje por los programas NetGene2 y HSF (0.91 vs 0.24; 83.31 vs 71.14, respectivamente) y desapareció en el caso de SSF.

El aceptor salvaje del intrón 11 no fue identificado por tres de los programas (NNSplice, SSF y ASSP), mientras que la secuencia mutante fue identificada como aceptor por el programa ASSP con un *score* de 3.126 (valor mínimo=2.2) y con mayor *score* que el aceptor salvaje por el programa HSF (58.23 vs 87.17).

Tabla 35: Predicción de sitios de corte-empalme

I	Mutación	Sitio <i>splicing</i>	Secuencia					
				NNSplice	SSF	ASSP	Netgene2	HSF
	Salvaje		ACTGTCCACG^GTGAGGGGGC	0.98	84.0	10.473	0.94	91.2
6	IVS6+5G>A	donador	ACTGTCCACG^GTGAAGGGGC	0.0	69.5	NI	0.55	79.04
	Salvaje		CGGGACACAG^GGACTCGAAG	0.0	NI	NI	0.34	58.23
11	IVS11-9G>A	aceptor	CAGGACACAG^GGACTCGAAG	0.0	NI	3.126	0.34	87.17
	Salvaje		CAGGTTGTTG^GTGCCGTGGCC	0.0	77.4	NI	0.91	83.31
29	IVS29+5G>A	donador	CAGGTTGTTG^GTGCATGGCC	0.0	NI	NI	0.24	71.14

I: Intrón

NI: no se identifica el sitio

Splice Site Prediction by Neural Network (NNSplice): El valor mínimo para los sitios donadores y aceptores es de 0.40.

Splicesitefinder (SSF): El valor mínimo de los sitios donadores y aceptores es 65 y el máximo es 100

Alternative Splice Site Predictor (ASSP): El valor mínimo de los sitios aceptores y donadores es 2.2 y 4.5, respectivamente, para que la identificación sea correcta en el 75% (sitio aceptor) y 80% (sitio donador) de los sitios identificados.

Netgene2: Los valores mínimos para los sitios donadores son 95.0% (alta confianza) y 50% (casi todos verdaderos) y para los sitios aceptores 95.0% (alta confianza) y 20.0% (casi todos verdaderos).

Human Splicing Finder Version 2.4 (HSF): Normaliza tomando el valor salvaje como referencia.

4.- Estudios familiares

Para realizar el estudio familiar, se invitó a participar a los familiares de los casos índices, en los que se había identificado mutación. Sin embargo, no se pudo completar en todas las familias, dado que algunos familiares habían fallecido y otros declinaron la invitación a participar en el estudio.

Los familiares que accedieron y que firmaron el consentimiento informado fueron evaluados clínica y genéticamente.

A continuación, se detallan datos de todos los casos índice, en los que se ha identificado mutación en el gen *MyBPC3*, y de los familiares a los que se tuvo acceso. Los datos se agruparon según el tipo de mutación: *missense*, de truncamiento o *in frame*.

4.1.- Familias con mutaciones *missense*

4.1.1.- Familia H73: Mutación D75N

Se testaron 5 familiares del caso índice (II:4) de la familia H73. Dos de ellos eran portadores de la mutación, uno presentaba cardiopatía isquémica (II:6) y el segundo estaba aparentemente sano (II:7). En el momento de este análisis, los tres portadores de la mutación contaban con más de 68 años. De los tres familiares que no presentaban la mutación, dos estaban sanos (II:2 y III:1) y otro tenía bloqueo de rama izquierda sin hipertrofia (II:3).

La familia H73 no tiene antecedentes de MS y el único evento registrado fue la muerte, de origen cardiovascular, de un familiar a los 83 años (I:1) y del que se carece de estudio genético (Tabla 36 y Figura 21).

Tabla 36: Datos clínicos de los portadores de la mutación D75N en la familia H73

CASO	II-4*	II-6	II:7
SEXO	F	F	F
EDAD DIAGNÓSTICO	66	No Dx	No Dx
EDAD SEGUIMIENTO	72	71	68
MÁX GROSOR (mm)	18	12	-
SÍNCOPE	-	-	-
OBST	-	-	-
RATA	-	-	¿
TV/FV	-	¿	¿
AFMS	-	-	-
NYHA	II	II	I
ECG	T(-)	BRI	N
INTERVENCIONES	-	-	-
EVENTOS	-	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; T(-): ondas T negativas; BRI: bloqueo de rama izquierda.

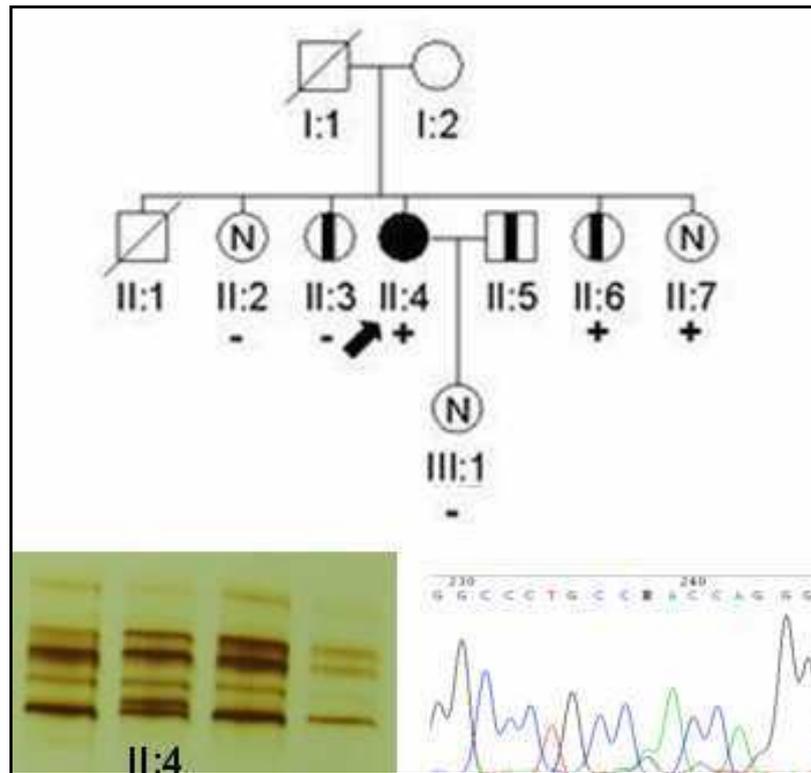


Figura 21: Pedigree de la familia H73. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice. Los símbolos que están rellenos de negro son casos con MCH, los que tienen una línea vertical negra corresponden a familiares que se consideraron que estaban posiblemente afectados y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos que están vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación y – indica no portador de la misma. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice (II:4), portador de la mutación D75N.

4.1.2.- Familia H42: Mutación A216T

La familia H42 presentaba antecedentes de MS ya que el padre del caso índice murió súbitamente a los 38 años.

El caso índice (II:6) era una mujer con MCH, obstrucción medioventricular y subaórtica y con fisiología restrictiva. Presentó trombosis, en dos ocasiones, tras un reemplazo valvular mitral y, finalmente, se le tuvo que realizar trasplante cardiaco ortotópico (Tabla 37 y Figura 22).

Se testó a una hermana (II:5) que estaba sana y era salvaje para dicha mutación.

Tabla 37: Datos clínicos del caso índice de la familia H42, portador de la mutación A216T

CASO	II-6*
SEXO	F
EDAD DIAGNÓSTICO	34
EDAD SEGUIMIENTO	41
MÁX GROSOR (mm)	25
SÍNCOPE	-
OBST	+++
RATA	+
TV/FV	-
AFMS	+
NYHA	III-IV
ECG	FA/ HVI
INTERVENCIONES	ASA/ DAI/ SVM/ TXC

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma; F: femenino; FA: fibrilación auricular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; ASA: ablación septal con alcohol; DAI: desfibrilador automático implantable; SVM: sustitución válvula mitral; TXC: trasplante cardiaco.

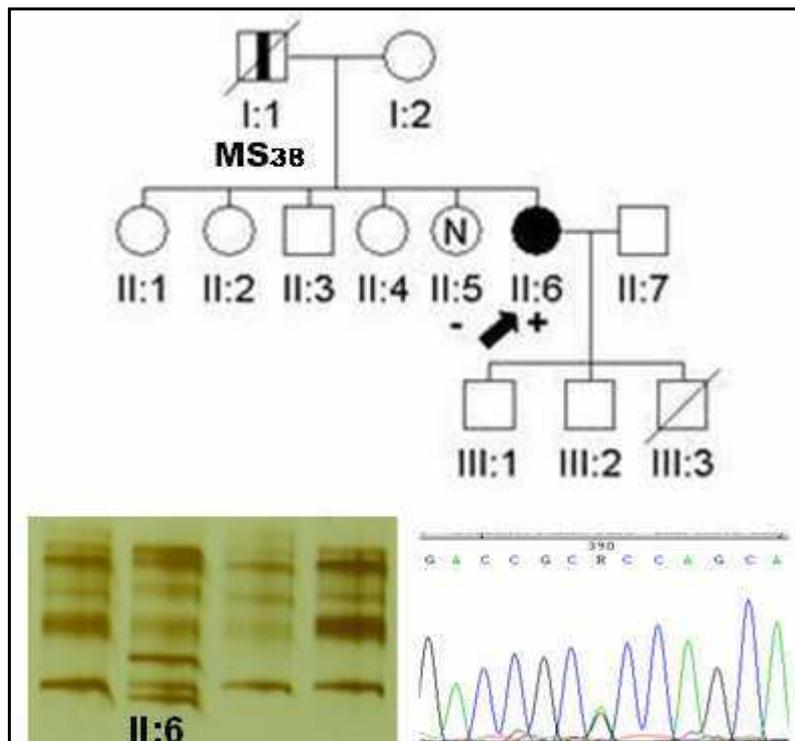


Figura 22: Pedigree de la familia H42. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice. Los símbolos que están rellenos de negro son casos con MCH, los que tienen una línea vertical negra corresponden a familiares que se consideraron que estaban posiblemente afectados y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. MS significa muerte súbita La N significa fenotipo normal y los símbolos que están vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación A216T y - indica no portador de la misma. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice (II:6).

4.1.3.- Familia H161: Mutación R495W

El caso índice de la familia H161 estaba diagnosticado de MCH asociada a HTA. Un hermano del caso índice (II:3) falleció con diagnóstico de MCH.

No fue posible estudiar la cosegregación de la enfermedad con la mutación en la familia (Tabla 38 y Figura 23).

4.1.4.- Familias H147 y H614. Mutación R502Q

Se realizó el estudio genotípico y fenotípico en cuatro familiares de los casos índice de las familias (H147 y H614).

Se testó a un hermano y a dos hijos del caso índice de la familia H147 (II:2, III:3 y III:4). Su hermano había sido diagnosticado de MCH (23mm) con 50 años y era portador de la mutación R502Q. Uno de sus hijos era portador de la mutación, y a los 34 años tenía un grosor de la pared del ventrículo de 11mm y presentaba anormalidades en el ECG. El segundo hijo estaba sano y era salvaje para la mutación. Además se testó al padre del caso índice de la familia H614 (I:1) que fue diagnosticado de MCH (17mm), gracias al estudio familiar y resultó ser portador de la mutación (Tabla 39 y Figura 24).

4.1.5.- Familia H120: Mutación T957S

El caso índice de la familia H120 fue diagnosticado de MCH, con hipertrofia ligera (12 mm) y anormalidades en el ECG a los 44 años. Además, presentaba alguna trabeculación en el ápice y hendiduras que sugieren posibilidad de no compactación.

Se realizó el estudio fenotípico de los dos hijos del caso índice: su hija es fenotípicamente normal (III:2) y su hijo, que a los 20 años presentó ECG normal, tenía 10 mm de grosor en la pared del VI y ligera trabeculación apical. No ha sido posible estudiar la cosegregación de la enfermedad con la mutación en esta familia, ya que no disponemos de muestras para poder llevar a cabo el estudio genético (Tabla 40 y Figura 25).

Tabla 38: Datos clínicos del caso índice de la familia H161, portador de la mutación R495W

CASO	II-4*
SEXO	M
EDAD DIAGNÓSTICO	71
EDAD SEGUIMIENTO	75
MÁX GROSOR (mm)	18
SÍNCOPE	-
OBST	-
RATA	-
TV/FV	+
AFMS	-
NYHA	I
ECG	FA/ HVI/ T(-)
INTERVENCIONES	-
EVENTOS	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. M: masculino; FA: fibrilación auricular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas.

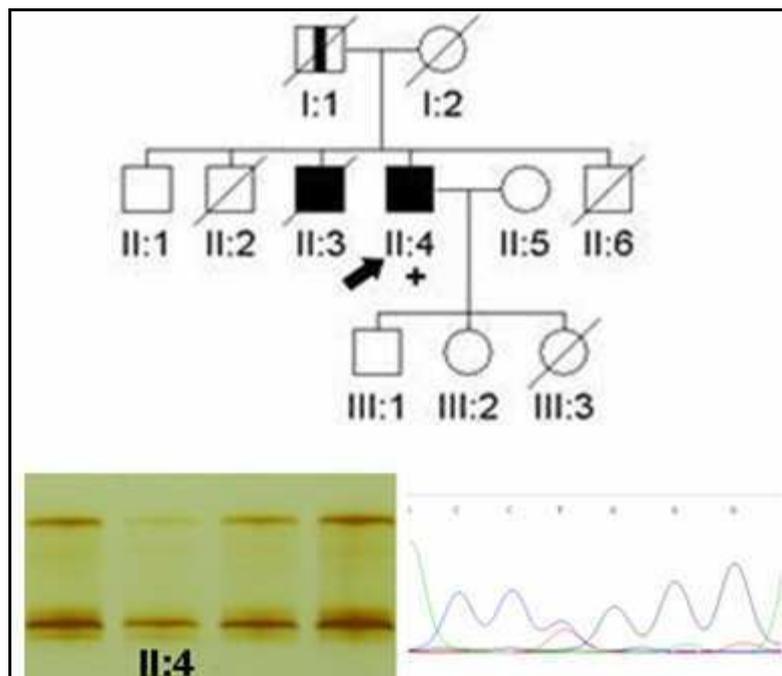


Figura 23: Pedigree de la familia H161. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice. Los símbolos que están rellenos de negro son casos con MCH, los que tienen una línea vertical negra corresponden a familiares que se consideraron que estaban posiblemente afectados y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. Los símbolos que están vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación R495W. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice (II:4).

Tabla 39: Datos clínicos de los portadores de la mutación R502Q en las familias H147 y H614

CASO	H147			H614	
	II-4*	II-2	III-4	III-3*	I-1
SEXO	M	M	M	M	M
EDAD			No		
DIAGNÓSTICO	42	50	Dx	15	68
EDAD					
SEGUIMIENTO	66	70	34	36	69
MÁX GROSOR (mm)	20	23	11	36	17
SÍNCOPE	-	+	-	+	-
OBST	-	-	-	++	-
RATA	-	+	-	+	-
TV/FV	-	+	-	+	-
AFMS	-	-	-	-	-
NYHA	II	II	I	I	I
ECG	T(-)	HVI/ T(-)	Q	FA/ HVI/ Q	N
INTERVENCIONES	MIO MP	-	-	DAI	-
EVENTOS	-	-	-	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. M: masculino; FA: fibrilación auricular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; Q: ondas Q; N: normal; MIO: miectomía; MP: implante de marcapasos; DAI: desfibrilador automático implantable.

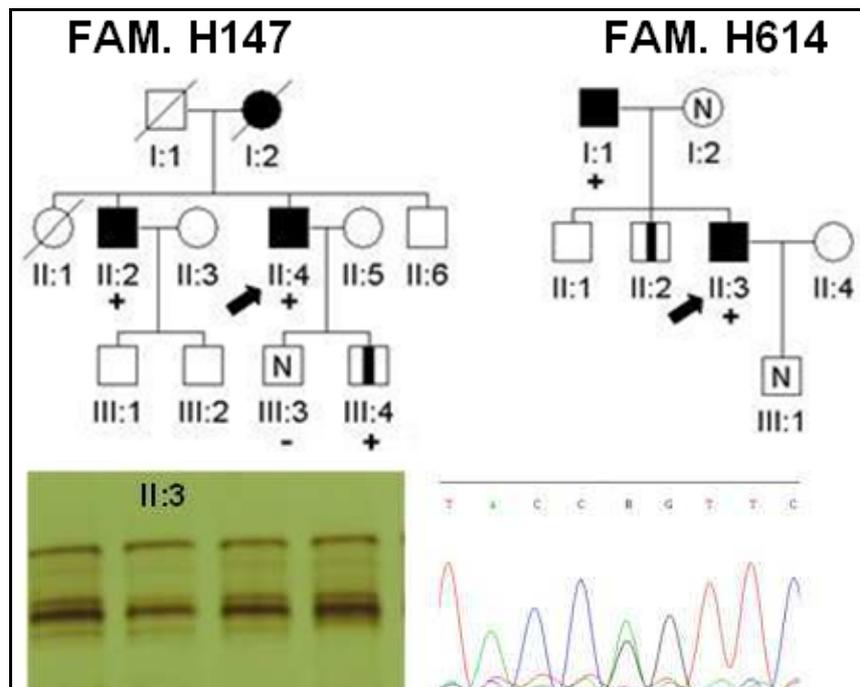


Figura 24: Pedigrees de las familias H147 y H614. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice. Los símbolos que están rellenos de negro son casos con MCH, los que tienen una línea vertical negra corresponden a familiares que se consideraron que estaban posiblemente afectados y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos que están vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación R502Q y - indica no portador de la misma. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H614 (II:3).

Tabla 40: Datos clínicos del caso índice de la familia H120, portador de la mutación T957S

CASO	II-3*
SEXO	M
EDAD DIAGNÓSTICO	44
EDAD SEGUIMIENTO	56
MÁX GROSOR (mm)	12
SÍNCOPE	-
OBST	-
RATA	-
TV/FV	-
AFMS	-
NYHA	II
ECG	HVI Q
INTERVENCIONES	-
EVENTOS	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma; M: masculino; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; Q: ondas Q.

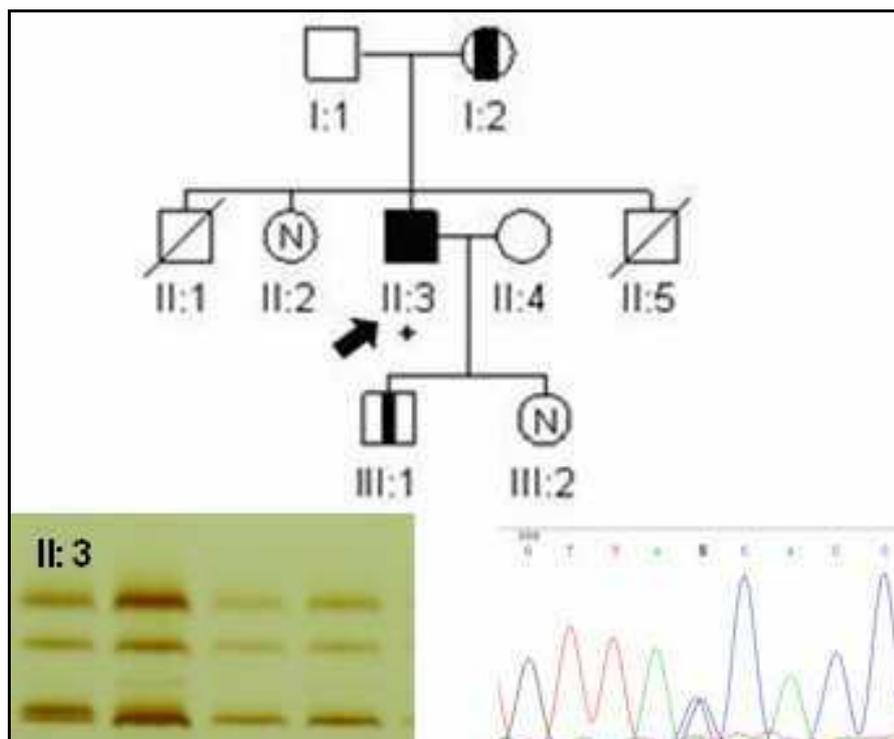


Figura 25: Pedigree de la familia H120. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice. Los símbolos que están rellenos de negro son casos con MCH, los que tienen una línea vertical negra corresponden a familiares que se consideraron que estaban posiblemente afectados y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos que están vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación T957S. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice (II:3).

4.1.6.- Familias H153, H166 y H641: Mutación E542Q

La mutación E542Q se identificó en tres familias. El estudio genético ha sido posible en la familia H153. Se pudieron estudiar cuatro familiares del caso índice de la familia H153: uno era portador de la mutación (III:4) y tenía características clínicas sugestivas de enfermedad y los otros tres eran salvajes para la mutación E542Q. De los tres familiares salvajes, un hijo (III:3) y un sobrino (III:2), del caso índice, estaban sanos. El tercer familiar salvaje era un hermano del caso índice, por parte de madre (II:1), que cumplía criterios diagnósticos de MCH, con hipertrofia ligera (17 mm de grosor) (Tabla 41 y Figura 26). No hubiera sido necesario testar a III:2 ya que su padre no es portador de la mutación, pero la muestra de este familiar se obtuvo con posterioridad a la de su hijo.

Existían antecedentes de MS en la familia H166, ya que dos primos del caso índice de esta familia (III:1 y III:2) sufrieron muerte súbita a los 40 y 45 años, respectivamente. Desafortunadamente carecemos de datos genéticos de los mismos (Tabla 41 y Figura 26).

Tabla 41: Datos clínicos de pacientes diagnosticados de MCH y/o portadores de la mutación E542Q en las familias H153, H641 y H166

CASO	H153			H641	H166
	II-4*	III-4	II-1	II-2*	III-7*
PRESENTA MUTACIÓN	si	si	no	si	si
SEXO	F	M	M	F	F
EDAD					
DIAGNÓSTICO	44	16	58	65	53
EDAD					
SEGUIMIENTO	51	17	70	73	61
MÁX GROSOR (mm)	20	14	17	28	23
SÍNCOPE	-	-	-	-	-
OBST	+++	-	-	-	-
RATA	+	-	-	-	-
TV/FV	-	-	-	-	-
AFMS	-	-	-	-	+
NYHA	II	I	I	II	III
ECG	HVI/T(-)	HVI	N	FA/Q/ST	FA
INTERVENCIONES	SVM	-	-	-	MP
EVENTOS	-	-	ACV(70)	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; FA: fibrilación auricular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; N: normal; Q: ondas Q; ST: alteraciones en la repolarización; SVM: sustitución valvular mitral; MP: implante de marcapasos; ACV: accidente cerebro-vascular isquémico.

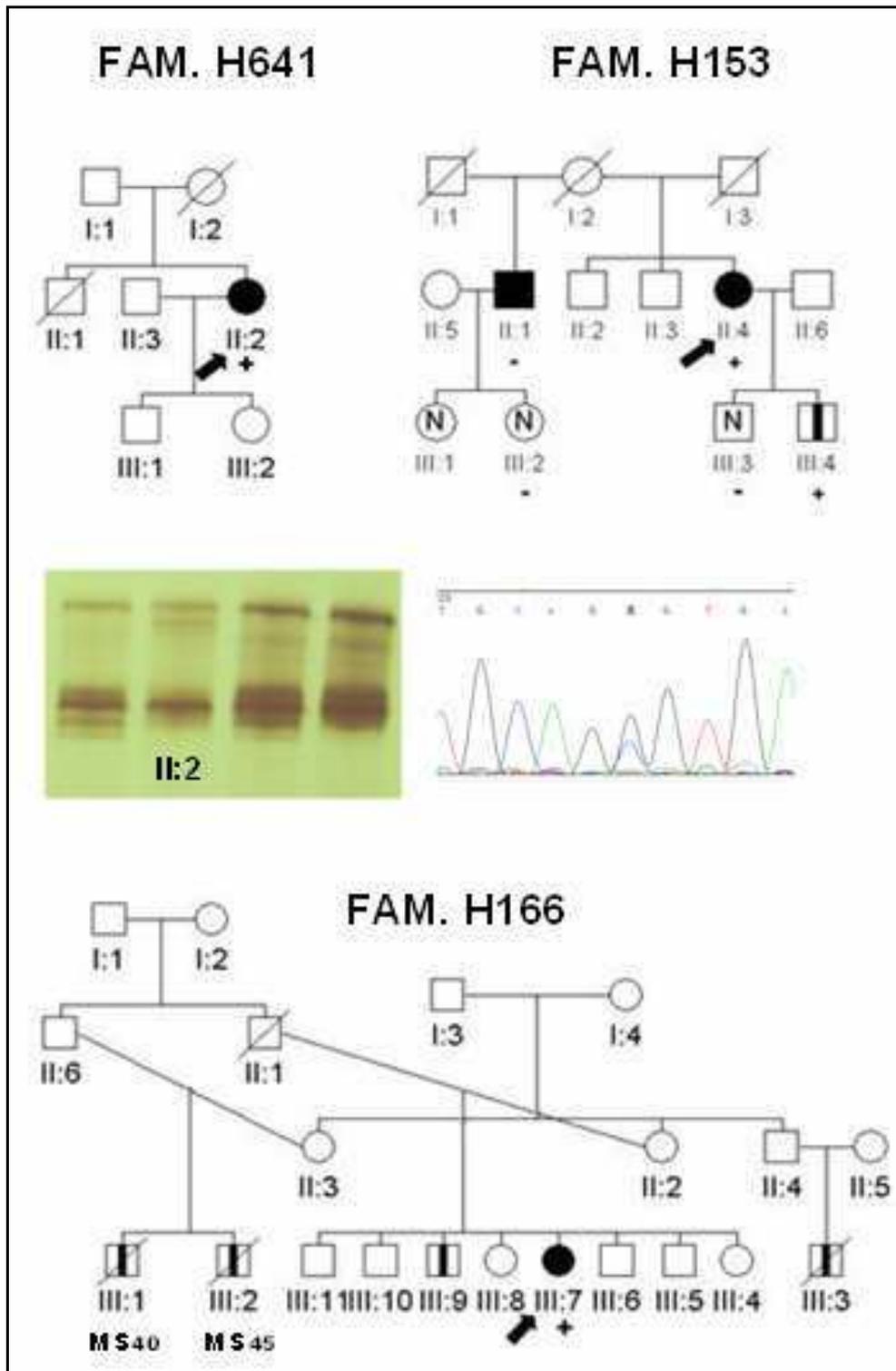


Figura 26: Pedigrees de las familias H641, H153 y H166. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, los que tienen una línea vertical negra corresponden a familiares que estaban posiblemente afectados y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. MS significa muerte súbita. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación E542Q y - indica no portador. En la parte central de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H641 (II:2).

4.1.7.- Familias H18 y H49: Mutación R1022P

La mutación R1022P se identificó en las familias H18 y H49 de esta Tesis Doctoral. El estudio genético de la familia H18 no ha sido posible, por no disponer de las muestras necesarias. Sin embargo, se testaron 8 familiares del caso índice de la familia H49 (II:2, III:4, III:5, III:8, III:10, IV:1, IV:3 y IV:5). Tres de ellos fueron diagnosticados de MCH y eran portadores de la mutación R1022P (II:2, III:4 y III:5). De los cinco familiares que resultaron salvajes para la mutación, tres estaban sanos (III:8, III:10 y IV:3) y dos presentaban alteraciones electrocardiográficas sugestivas de enfermedad (IV:1 y IV:5) del caso índice (Tabla 42 y Figura 27).

Tabla 42: Datos clínicos de pacientes diagnosticados de MCH y/o portadores de la mutación R1022P en las familias H49 y H18

FAMILIA CASO	H49						H18
	III-2*	III-4	III-5	II-2	IV-1	IV-5	II-5*
PRESENTA MUTACIÓN	si	si	si	si	no	no	si
SEXO	F	M	F	F	M	M	M
EDAD DIAGNÓSTICO	21	44	27	67	22	17	52
EDAD SEGUIMIENTO	46	45	41	67	29	22	76
MÁX GROSOR (mm)	14	24	16	15	12	13	20
SÍNCOPE	+	-	-	-	-	-	-
OBST	-	-	-	-	-	-	-
RATA	-	¿	-	¿	-	-	-
TV/FV	+	¿	-	¿	-	-	+
AFMS	-	-	-	-	-	-	-
NYHA	II	I	I	II	I	I	I
ECG	FA/Q/BCRD	T(-)	HVI/Q	BCRI	HVI/Q	HVI/Q	FA/ HVI/ Q/ST
INTERVENCIONES	-	-	-	-	-	-	-
EVENTOS	-	-	-	-	-	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; FA: fibrilación auricular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; Q: ondas Q; BCRD: bloqueo de rama derecha del haz de His; BCRI: bloqueo de rama izquierda del haz de His; ST: alteraciones en la repolarización;

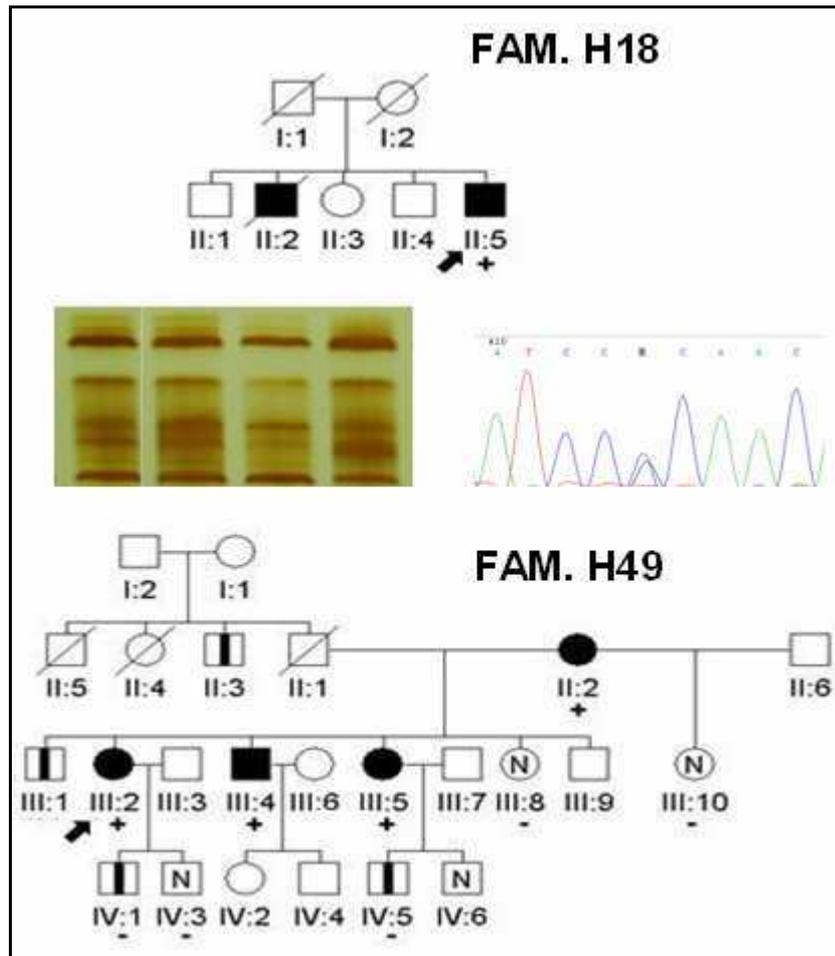


Figura 27: Pedigrees de las familias H18 y H49. Los cuadrados son hombres y los círculos mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, una línea vertical negra corresponde a posiblemente afectado y la línea diagonal indica individuo fallecido. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación R1022P y – indica no portador. También, se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H18 (II:5).

4.1.8.- Familia H279: Mutación V471E

La mutación fue identificada en un hombre diagnosticado de MCH a los 57 años y con HTA. La madre del caso índice falleció como consecuencia de un accidente cerebro-vascular (ACV), con menos de 40 años.

Se realizó el estudio genotípico y fenotípico de sus dos hijas (III:1 y III:2). Una de ellas estaba sana y no era portadora de la mutación y la otra (III:2), aunque era portadora de la mutación, estaba sana a los 25 años (Tabla 43 y Figura 28).

Tabla 43: Datos clínicos portadores de la mutación V471E en la familia H279

CASO	II-1*	III-2
SEXO	M	F
EDAD DIAGNÓSTICO	57	No Dx
EDAD SEGUIMIENTO	65	25
MÁX GROSOR (mm)	17	9
SÍNCOPE	-	-
OBST	-	-
RATA	-	-
TV/FV	-	-
AFMS	-	-
NYHA	I	I
ECG	HVI/T(-)	N
INTERVENCIONES	-	-
EVENTOS	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; Dx: diagnóstico; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; N: normal.

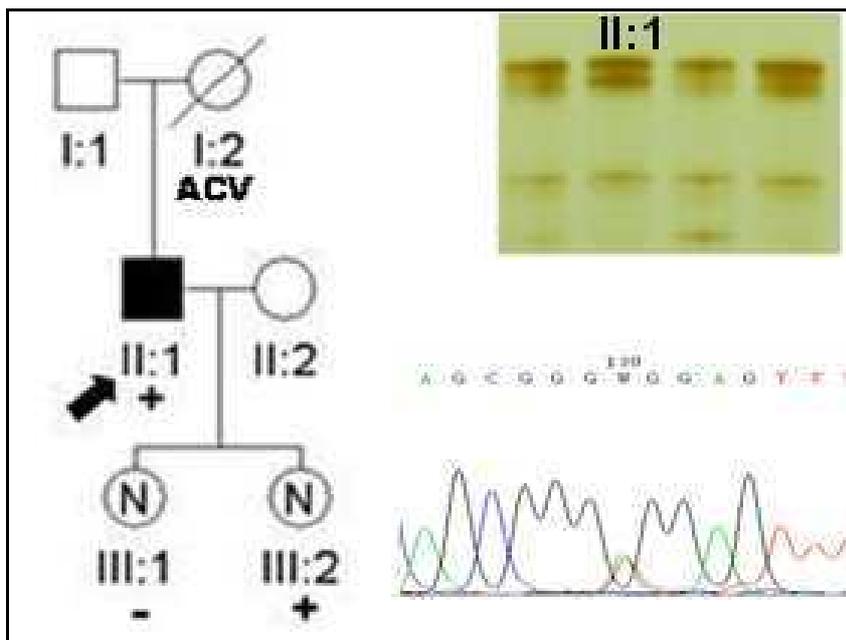


Figura 28: Pedigree de las familia H279. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación V471E y - indica no portador. En la parte derecha de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H279 (II:1).

4.1.9.- Familia H95: Mutación E1179K

Además del caso índice de la familia H95, se realizó el estudio genotípico y fenotípico de ocho familiares. Uno estaba sano y no presentaba mutación. De los siete portadores de la mutación, dos se diagnosticaron de MCH y cinco continuaban estando sanos en el momento del análisis. Los tres portadores que estaban diagnosticados de MCH (II:1*, II:3 y II:4), lo fueron pasados los 60 años. El resto de portadores eran individuos jóvenes (20±12 años), con la excepción de un sobrino del caso índice (III:4) que contaba con 40 años, tenía ECG normal y se desconoce el resultado del ECO (Tabla 44 y Figura 29).

Esta familia no tiene antecedentes de MS pero dos de sus miembros murieron, superados los 60 años, a consecuencia de un evento adverso cardiovascular no especificado que podría estar relacionado con la enfermedad familiar

Tabla 44: Datos clínicos portadores de la mutación E1179K en la familia H95

CASO	II-1*	II:3	II-4	III:2	III:4	III:6	IV-I	IV-II
SEXO	M	F	F	F	F	F	F	M
EDAD								
DIAGNÓSTICO	64	72	63	No Dx		No Dx		No Dx
EDAD								
SEGUIMIENTO	69	72	67	32	40	29	15	10
MÁX GROSOR (mm)	22	13	19	8	¿	7	¿	7
SÍNCOPE	-	¿	-	-	¿	-	-	-
OBST	-	¿	+	-	¿	-	-	-
RATA	-	¿	-	¿	¿	-	¿	¿
TV/FV	-	¿	-	¿	¿	-	¿	¿
AFMS	-	-	-	-	-	-	-	-
NYHA	II	¿	II	I	¿	I	I	I
ECG	FA/HVI/T(-)/Q	ST	HVI	N	¿	N	N	N
INTERVENCIONES	-	-	-	-	-	-	-	-
EVENTOS	ACV(66)	-	-	-	-	-	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; ¿: no se disponen de datos; Dx: diagnóstico; FA: fibrilación auricular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; Q: ondas Q; ST: alteraciones en la repolarización; N: normal. ACV: accidente cerebro-vascular

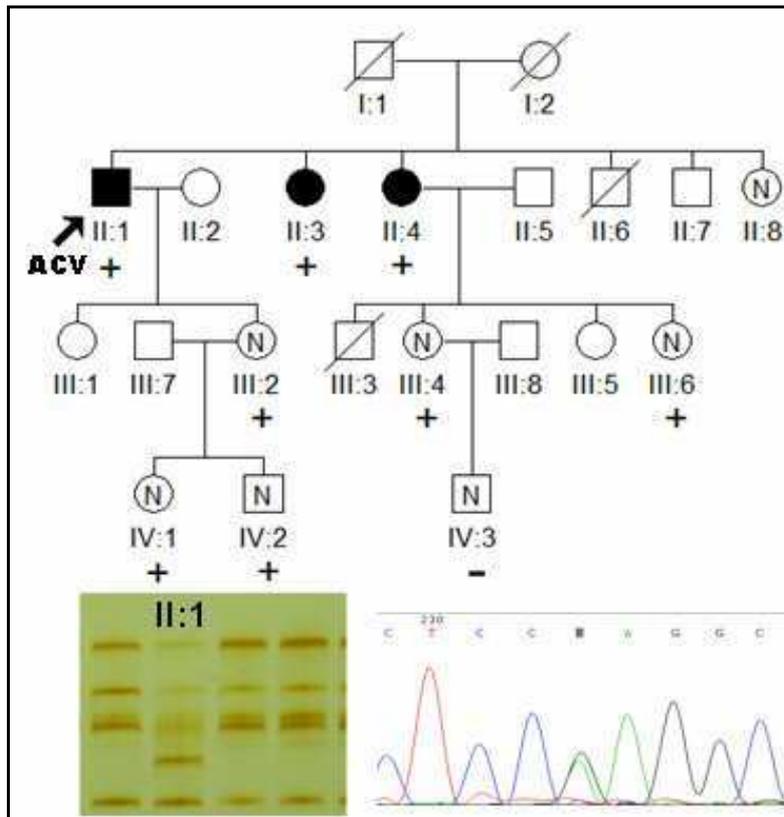


Figura 29: Pedigree de las familia H95. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación E1179K y – indica no portador. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H95 (II:1).

4.2.- Mutaciones que causan truncamiento

4.2.1.- Familia H13: Mutación Q327fs

El caso índice de la familia H13 (II:7) fue diagnosticado de MCH (19mm) a los 64 años y como factor de riesgo ambiental tiene el consumo de tabaco. Además, en esta familia hay otros dos miembros diagnosticados de MCH: una de sus hermanas (II:4) y una de sus hijas (III:1). El estudio familiar permitió diagnosticar de MCH a la hija del caso índice, que tenía un grosor de la pared del ventrículo de 16mm, ECG normal y era portadora de la mutación (Tabla 45 y Figura 30). Desafortunadamente, fue imposible estudiar la cosegregación de la enfermedad con la mutación en la hermana del caso índice, porque no se dispuso de muestra para la realización del estudio genético.

Tabla 45: Datos clínicos portadores de la mutación Q327fs en la familia H13

CASO	II-7*	III-1
SEXO	M	F
EDAD DIAGNÓSTICO	64	37
EDAD SEGUIMIENTO	73	37
MÁX GROSOR (mm)	19	16
SÍNCOPE	+	-
OBST	-	-
RATA	¿	¿
TV/FV	+	¿
AFMS	-	-
NYHA	III	I
ECG	FA/Q	N
INTERVENCIONES	-	-
EVENTOS	MUERTE X IC (73)	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; ¿: no se disponen de datos; FA: fibrilación auricular; Q: ondas Q; N: normal. XIC: por insuficiencia cardiaca.

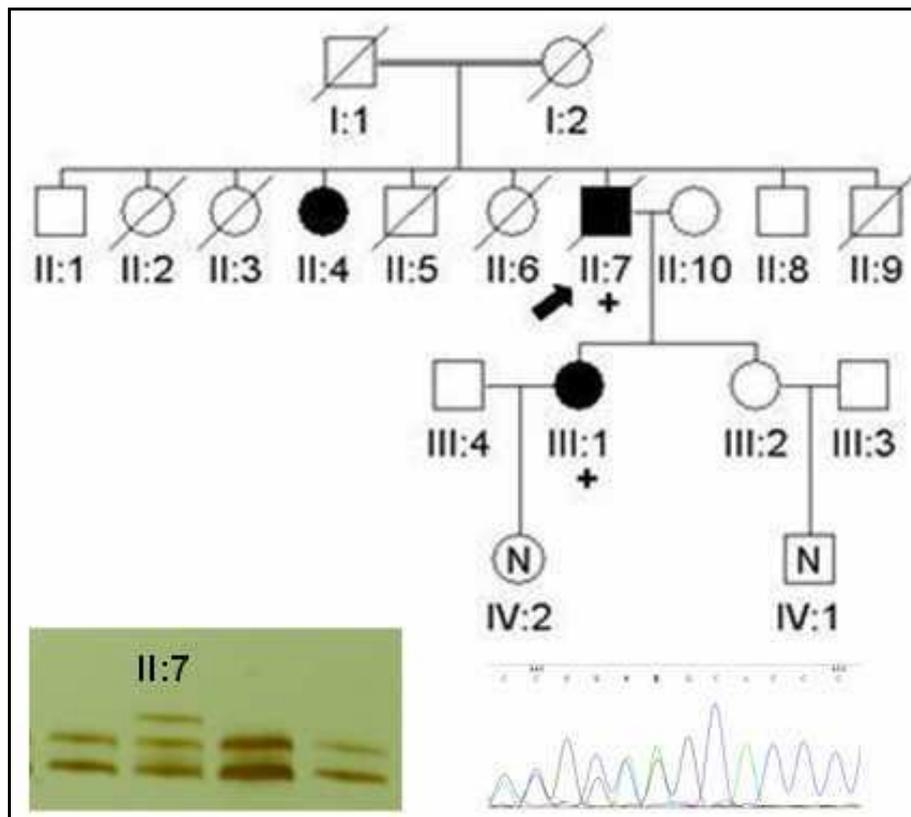


Figura 30: Pedigree de las familia H13. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH y las líneas diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación Q327fs. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H13 (II:7).

4.2.2.- Familia H37: Mutación K600fs

El caso índice de la familia H37 era un hombre que fue diagnosticado con 44 años, con un grosor de 23mm, anomalías en el ECG y practicaba deporte de manera no competitiva. Se llevó a cabo el estudio fenotípico y genotípico de cinco de sus familiares (I:2, II:1, III:2, III:3 y III:4). Su hermana (II:1) que había sido diagnosticada de MCH (21mm) y a la que se le colocó un marcapasos, resultó ser portadora de la mutación. Los otros cuatro familiares testados estaban sanos y eran salvajes para esta mutación (Tabla 46 y Figura 31).

Tabla 46: Datos clínicos portadores de la mutación K600fs en la familia H37

CASO	III-2*	III-1
SEXO	M	F
EDAD DIAGNÓSTICO	44	50
EDAD SEGUIMIENTO	58	59
MÁX GROSOR (mm)	23	21
SÍNCOPE	-	+
OBST	++	-
RATA	+	+
TV/FV	-	¿
AFMS	-	-
NYHA	II	II
ECG	FA/T(-)/Q	FA/BRI
INTERVENCIONES	-	MP
EVENTOS	EMBOLIA MMII (55)	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; ¿: no se disponen de datos; FA: fibrilación auricular; T(-): ondas T negativas; Q: ondas Q; BRI: bloqueo de rama izquierda; MP: implante de marcapasos; MMII: miembros inferiores.

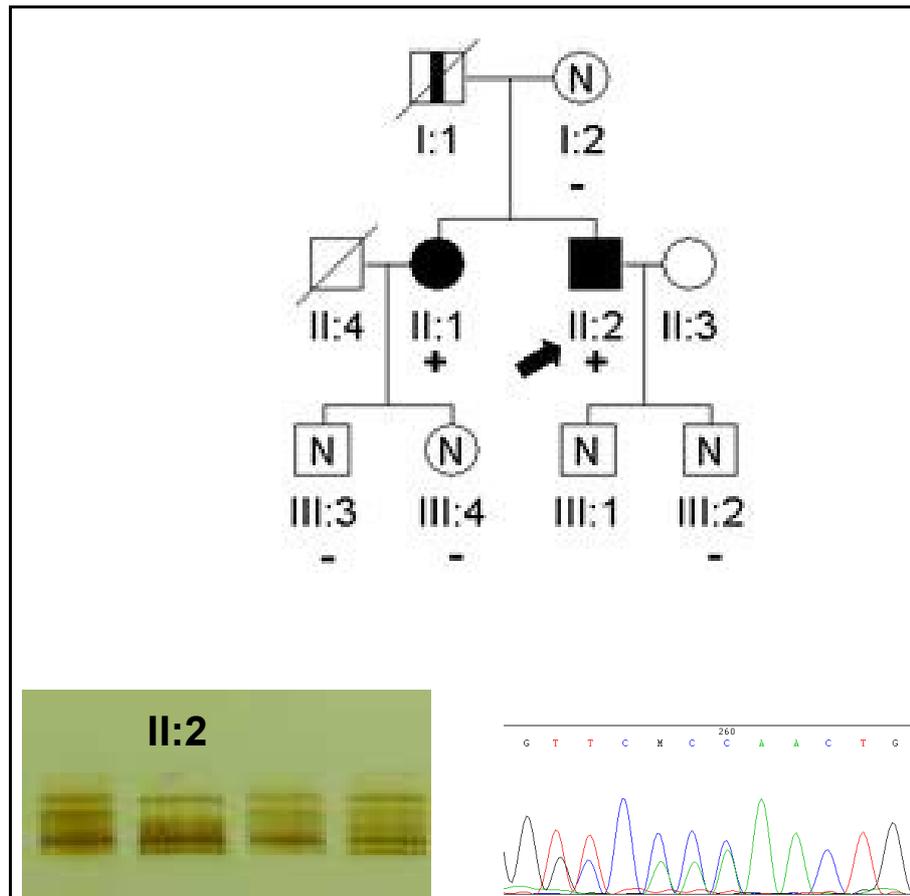


Figura 31: Pedigree de las familia H37. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, las líneas negras verticales indican posibles afectados y las diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación y - salvaje. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H37 (II:2), portador de la mutación K600fs.

4.2.3.- Familia H160: Mutación P955fs

La familia H160 presenta antecedentes de MS ya que el padre del caso índice murió súbitamente a los 51 años.

El caso índice (II:2) era un hombre que fue diagnosticado de MCH a los 36 años, presentaba un grosor de 28 mm y anormalidades en el ECG. Los hijos del caso índice accedieron a participar en el estudio. El resultado del estudio fenotípico determinó que los dos eran portadores de la mutación. Su hija (IV:1) presentaba un grosor de 21mm y anormalidades en el ECG, por lo que se diagnosticó de MCH. Su hijo (IV:2), a la edad de 23 años, tenía un grosor de 8mm, ondas Q y probablemente está afectado (Tabla 47 y Figura 32).

Tabla 47: Datos clínicos portadores de la mutación P955fs en la familia H160

CASO	III-2*	IV-1	IV-2
SEXO	M	F	M
EDAD DIAGNÓSTICO	36	16	No Dx
EDAD SEGUIMIENTO	49	28	23
MÁX GROSOR (mm)	28	21	8
SÍNCOPE	-	-	-
OBST	-	-	-
RATA	-	-	-
TV/FV	-	-	-
AFMS	+	+	+
NYHA	I	I	I
ECG	HVI/T(-)/Q	HVI/T(-)	Q
INTERVENCIONES	-	-	-
EVENTOS	-	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; No Dx: no diagnóstico; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; Q: ondas Q.

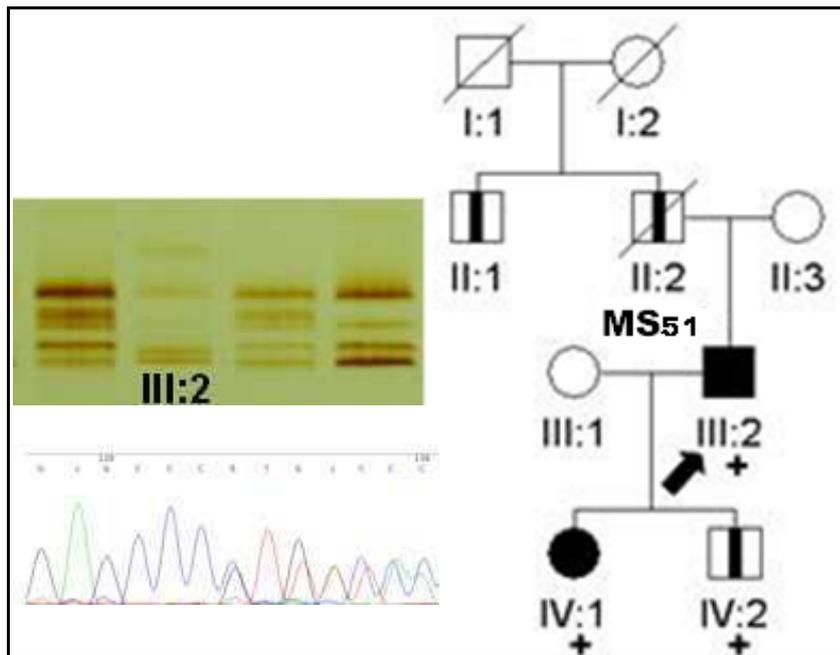


Figura 32: Pedigree de las familia H160. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, las líneas negras verticales posibles afectados y las diagonales individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación P955fs. En la parte izquierda de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H160 (III:2).

4.2.4.- Familia H56: Mutación IVS6+5G>A

La familia H56 tiene antecedentes de MS puesto que dos hermanas del caso índice (II:1 y II:2), que eran gemelas, murieron súbitamente a los 15 y 26 años, respectivamente.

Otro hermano del caso índice (II:5), que estaba diagnosticado de MCH, accedió a participar en el estudio. Tanto el caso índice (II:6) como su hermano eran portadores de la mutación IVS6+5G>A en homocigosis y tenían MCH con expresión severa (Ortiz y cols., 2009) (Tabla 48 y Figura 33).

Tabla 48: Datos clínicos portadores de la mutación IVS6+5G>A en la familia H56

	II-6*	II-5
EDAD DIAGNÓSTICO	II-6*	II-5
EDAD SEGUIMIENTO	F	M
MÁX GROSOR (mm)	34	28
SÍNCOPE	39	40
OBST	24	26
RATA	-	-
TV/FV	-	-
AFMS	+	-
NYHA	+	+
ECG	+	+
INTERVENCIONES	II	I
EVENTOS	T(-)	FA/ ST
CASO	DAI	-
SEXO	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; T(-): ondas T negativas; FA: fibrilación auricular; ST: alteraciones en la repolarización; DAI: desfibrilador automático implantable.

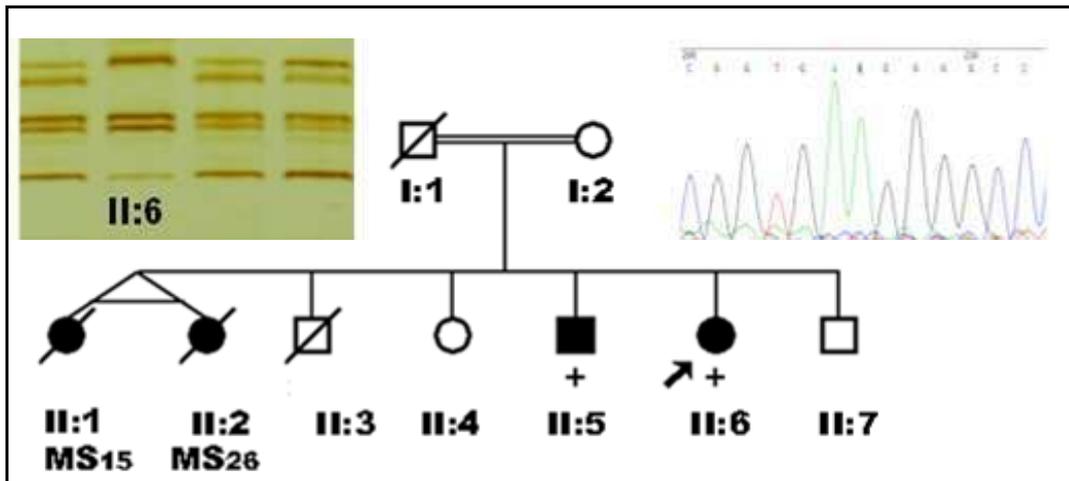


Figura 33: Pedigree de las familia H56. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, las líneas diagonales indican individuos fallecidos y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación IVS6+5G>A. En la parte superior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H56 (II:6).

4.2.5.- Familia H110: Mutación IVS11-9G>A

El caso índice de la familia H110 era una mujer joven diagnosticada de MCH septal, con ECG anormal, con enfermedad del sistema de conducción que practicaba deporte a nivel no competitivo.

El resultado del estudio genético del padre del caso índice determinó que era portador de la mutación. Al igual que su hija se diagnosticó de MCH septal asimétrica aunque su ECG era normal y no practicaba deporte (Tabla 49 y Figura 34).

Tabla 49: Datos clínicos portadores de la mutación IVS11-9G>A en la familia H110

CASO	II-2*	I-1
SEXO	F	M
EDAD DIAGNÓSTICO	21	58
EDAD SEGUIMIENTO	27	62
MÁX GROSOR (mm)	20	17
SÍNCOPE	-	-
OBST	-	+
RATA	-	-
TV/FV	-	-
AFMS	-	-
NYHA	I	I
ECG	HVI/T(-)/HBAI	N
INTERVENCIONES	-	-
EVENTOS	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; HBAI: hemibloqueo anterior izquierdo; N: normal.

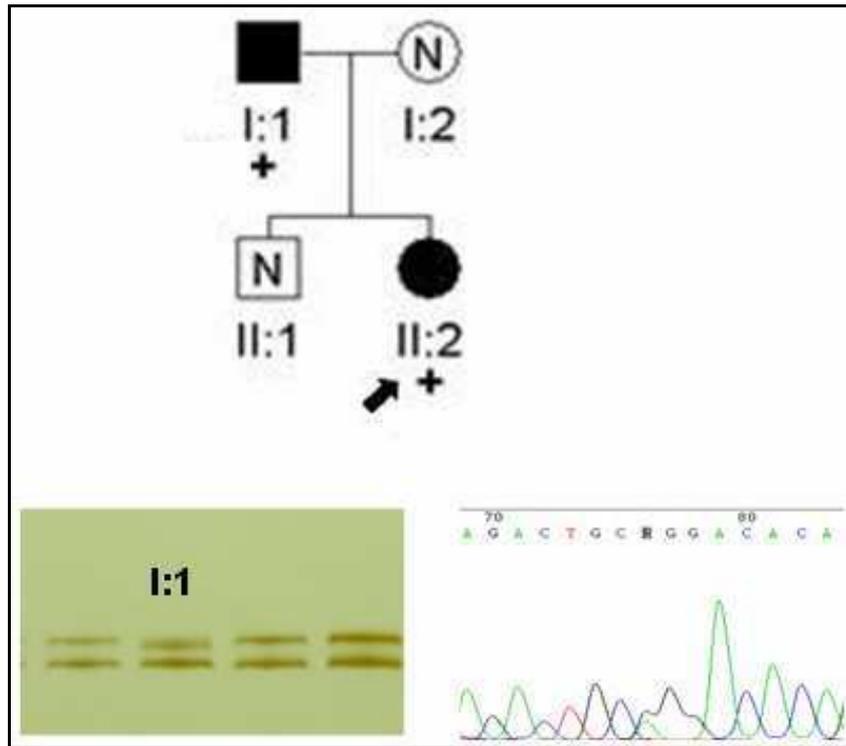


Figura 34: Pedigree de las familia H110. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH. La N significa fenotipo normal. + indica portador de la mutación IVS11-9G>A. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H110 (I:1).

4.2.6.- Familia H131: Mutación IVS29+5G>A

La familia H131 tiene antecedentes de MS, ya que un tío paterno falleció súbitamente a los 21 años y su abuelo materno lo hizo a los 40 años.

En el estudio fenotípico y genotípico de la familia participaron las dos hijas del caso índice (IV:4 y IV:5). Las dos eran portadoras de la mutación y tenían ECG normales cuando se inició el estudio. Una de ellas (IV:5) fue diagnosticada de MCH, gracias al estudio familiar, ya que tenía un grosor de 15 mm y a la otra (IV:4) se le han detectado, recientemente, anomalías en el ECG (Tabla 50 y Figura 35).

Tabla 50: Datos clínicos portadores de la mutación IVS29+5G>A en la familia H131

CASO	III-2*	IV-4	IV-5
SEXO	F	F	F
EDAD DIAGNÓSTICO MCH	45	No Dx	24
EDAD SEGUIMIENTO	54	33	31
MÁX GROSOR (mm)	41	10	15
SÍNCOPE	-	-	-
OBST	+	-	-
RATA	-	¿	¿
TV/FV	+	¿	-
AFMS	+	+	+
NYHA	III	I	I
ECG	HVI/ T(-)	N	N
INTERVENCIONES	DAI	-	-
EVENTOS	-	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; No Dx: no diagnóstico; ¿: no se dispone del dato; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; T(-): ondas T negativas; N: normal; DAI: desfibrilador automático implantable.

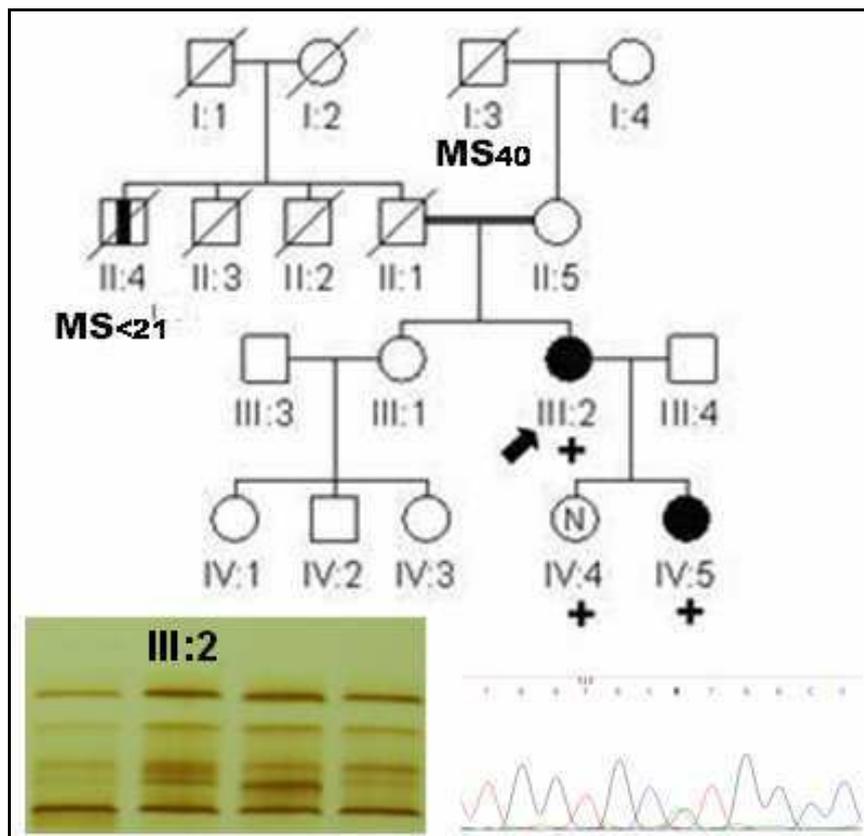


Figura 35: Pedigree de las familia H131. Los cuadrados son hombres y los círculos son mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, las líneas negras verticales indican posibles afectados y las diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación IVS29+5>A. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H131(III:2).

4.3.- Estudios familiares de las mutaciones *in frame*

4.3.1.- Familia H46: Mutación K504del

El caso índice de la familia H46, estudiado en esta Tesis Doctoral, era un hombre diagnosticado a los 35 años (III:1). El estudio familiar se llevó a cabo en 7 de sus familiares (II:5, II:7, II:8, III:2, III:4, IV:2 y IV:1). Tres de ellos eran portadores de la mutación: su padre (II:8) que había sido diagnosticado de MCH a los 59 años, un tío (II:7) que probablemente estaba afectado pero del que carecemos de datos fenotípicos por haber revisado en otro centro, y una hermana del caso índice (III:4) que, con 48 años, tenía un grosor de 9mm, un ECG normal. El resto de familiares testados (II:5, III:2, IV:2 y IV:1) estaban sanos y eran salvajes para esta mutación.

La familia en estudio no tiene MS asociadas. Entre los miembros de la misma se produjeron dos muertes por embolia (I:1 y II:6) que podrían estar relacionadas con la enfermedad y una muerte por cardiopatía en un individuo a los 70 años (II:10) (Tabla 51 y Figura 36).

Tabla 51: Datos clínicos portadores de la mutación K504del en la familia H46

CASO	III-1*	II-7	II-8	III-4
SEXO	M	M	M	F
EDAD	35	¿	59	No Dx
DIAGNÓSTICO				
MCH				
EDAD	52	¿	76	48
SEGUIMIENTO				
MÁX GROSOR (mm)	19	¿	17	9
SÍNCOPE	-	¿	-	-
OBST	-	¿	-	-
RATA	-	¿	+	-
TV/FV	-	¿	-	-
AFMS	-	-	-	-
NYHA	I	¿	II	I
ECG	HVI/Q	¿	Q	N
INTERVENCIONES	-	¿	MP	-
EVENTOS	-	¿	-	-

*: caso índice; MÁX: máximo; OBST: obstrucción subaórtica; RATA: respuesta anormal de la tensión arterial; TV/FV: taquicardia/fibrilación ventricular; AFMS: antecedentes familiares de muerte súbita; NYHA: clase funcional de la New York Heart Association; ECG: electrocardiograma. F: femenino; M: masculino; ¿: se desconoce; Dx: diagnóstico; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; Q: ondas Q; N: normal; MP: implante de marcapasos.

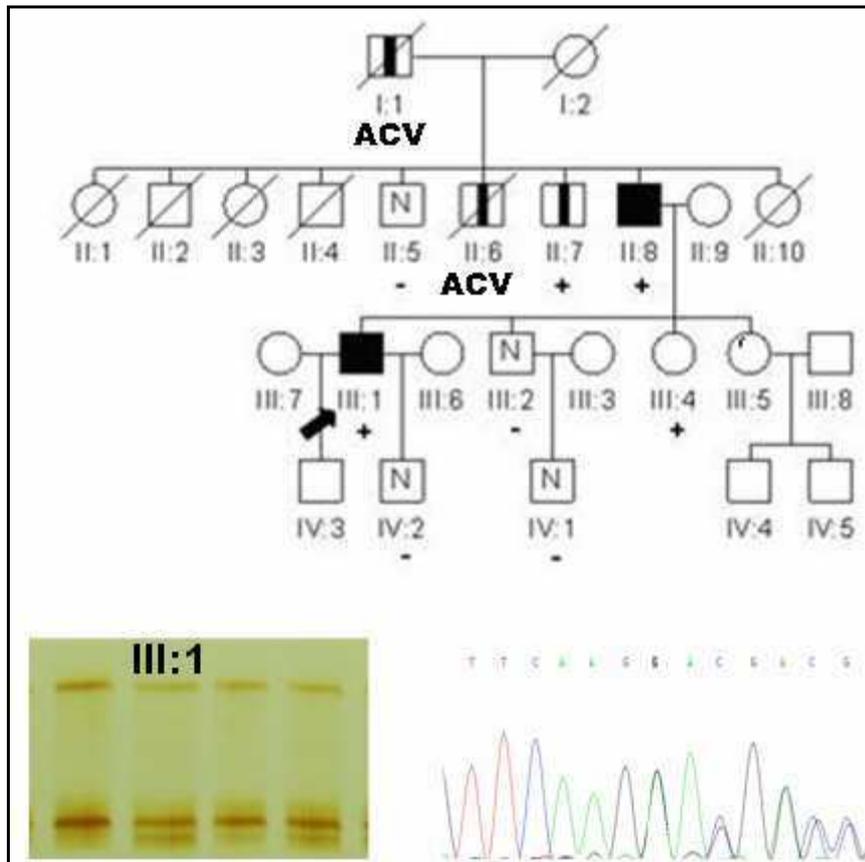


Figura 36: Pedigree de la familia H46. Los cuadrados son hombres y los círculos mujeres. La flecha indica el caso índice de la familia. Los símbolos rellenos de negro son casos con MCH, las líneas verticales negras corresponden a familiares posiblemente afectados y las diagonales indican individuos fallecidos. La N significa fenotipo normal y los símbolos vacíos corresponden a familiares no evaluados. + indica portador de la mutación K504del y – indica no portador de la misma. En la parte inferior de la figura se muestra el patrón de movilidad anormal en la SSCP y el electroferograma del caso índice de la familia H46 (III:1).

DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se ha realizado el *screening* de mutaciones para el gen *MyBPC3* en una cohorte de 130 pacientes con MCH que ya había sido analizada, previamente, para el gen *MYH7*. El *screening* de mutaciones en el gen *MyBPC3* se hizo mediante SSCP y posterior secuenciación de los fragmentos con movilidad anormal. Con el fin de descartar la presencia de mutaciones adicionales en otros genes del sarcómero, se realizó un *screening* de mutaciones conocidas en otros 12 genes utilizando una plataforma de genotipado.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el 23.8% de nuestra cohorte presenta una mutación en *MyBPC3* o en *MYH7* (25 mutaciones en 31 familias) y ninguna otra mutación de las incluidas en la plataforma de genotipado. Sin embargo, el hecho de no haber identificado mutaciones en el resto de genes sarcoméricos no descarta la presencia de alguna mutación nueva.

Se han identificado 16 mutaciones en el gen *MyBPC3* en 20 familias, cinco nuevas [D75N, V471E, Q327fs, IVS6+5G>A (homocigosis), y IVS11-9G>A] y 11 descritas con anterioridad o durante el procesamiento de los resultados que aquí se muestran.

La estrategia elegida para obtener la correlación genotipo-fenotipo en las diferentes mutaciones se ha basado en el uso de herramientas bioinformáticas, la realización de los estudios familiares, cuando ha sido posible, y en la integración de la información existente de estudios funcionales y familiares.

1.- Análisis genéticos

1.1.- Frecuencia de mutaciones en el gen *MyBPC3*

Las mutaciones en el gen *MyBPC3* están entre las causas más prevalentes de la MCH familiar (Richard y cols., 2003; Erdmann y cols., 2001). De hecho, se identifican un gran número de mutaciones en todas las poblaciones analizadas, aunque la frecuencia con la que aparecen varía (Tabla 52). En algunos trabajos, incluido el nuestro, se han obtenido frecuencias alrededor al 15%, mientras que en otros se supera el 50% (Niimura y cols., 1998; Alders y cols., 2003).

Tabla 52: Comparación de series de pacientes con MCH que han sido publicados con un estudio sistemático del gen *MyBPC3*

Referencia	País	Nº de pacientes	Nº de controles	Número y porcentaje mutaciones	Edad media cohorte
Van Driest y cols., 2004	USA	389	200	71 (18%)	41
Richard y cols., 2003	Francia	197	100	52 (26%)	¿
Olivotto y cols., 2008	Italia	203	150	68 (34%)*	43
Erdmann y cols., 2001	Alemania	110	¿	15 (14%)	¿
Andersen y cols., 2004	Dinamarca	81	100	10 (12%)	¿
Ingles y cols., 2005	Australia	80	150	11 (14%)	¿
Mörner y cols., 2003	Suecia	46	100	10 (22%)	62
Cardim y cols., 2005	Portugal	45	¿	5 (11%)	46
Jaaskelainen y cols., 2002	Finlandia	37	111	9 (24%)	50
Niimura y cols., 1998	USA	29**	100	16 (55%)	¿
Alders y cols., 2003	Holanda	22	100	16 (73%***)	¿
García-Castro y cols., 2009	España	10**	100	3 (30%)	¿
Esta Tesis Doctoral	España	130	200	16 (15%)	52
Total		1379	1311	302 (22%)	

*27 casos tenían la mutación E258K (ancestro común). ** Todas con presentación familiar. ***10 pacientes con la mutación W792fs, los autores realizaron un estudio adicional en 237 casos que demostró que está mutación era la responsable del 23% de los casos en su población (ancestro común).

Entre las causas que pueden explicar estas variaciones en los resultados se encuentran:

- Los criterios de selección de los candidatos: distintos tamaños de las cohortes, la inclusión o no de MCH familiar y/o esporádica, la edad de diagnóstico de los pacientes y la exclusión o no de individuos emparentados, entre otros.
- La sensibilidad de la técnica utilizada para el *screening* de variantes.
- La presencia de mutaciones en familias que tienen un antecesor común.
- Los criterios de definición de mutación, variables de efecto incierto y polimorfismo en los distintos trabajos publicados. De hecho, la frecuencia de mutaciones, en nuestros casos, aumenta del 15% al 17%, si consideramos variantes como R820Q (1 de los 130 casos índice; 0 de los 200 controles sanos) o R326Q (3 de los 130 casos índice; 1 de los 200 controles sanos). Dichas variantes han sido descritas en algunos trabajos como polimorfismos (Jaaskelainen y cols., 2002; Alders y cols., 2003), en otros como mutación

(Richard y cols., 2003; Morner y cols., 2003; Konno y cols., 2003; Nanni y cols., 2003) y en otros como variable modificadora (Van Driest y cols., 2004). Las dos variantes aparecen recogidas como variables de efecto incierto en <http://cardiogenomics.med.harvard.edu>.

1.2.- Tipos de mutaciones en el gen *MyBPC3*

Las mutaciones identificadas en el gen *MyBPC3* en esta Tesis Doctoral (Tabla 11 de resultados) y las mutaciones que se han recogido de la bibliografía (Figura 37: A) se pueden agrupar en tres categorías: mutaciones *missense*, mutaciones *in frame* y mutaciones que provocan señales prematuras de terminación (truncamiento).

Cuando se agrupan de esta manera las mutaciones recogidas de la literatura la frecuencia con la que aparecen cada uno de estos grupos es:

1. El 44.8% son mutaciones *missense*
2. El 1.2% son deleciones o inserciones de aminoácidos que no ocasionan un cambio de pauta en la lectura de los aminoácidos (mutaciones *in frame*).
3. El 54% son mutaciones que provocan señales prematuras de terminación (truncamiento), bien sean *nonsense*, *frameshift* o mutaciones en sitios de *splicing*. Las mutaciones *nonsense* son las menos frecuentes de estos tres grupos con un 19.1%, mientras los otros dos grupos aparecen con una frecuencia similar ($\approx 40\%$) (Figura 37: B).

Los resultados de esta Tesis Doctoral, tal como se observa en la Figura 37, muestran esa diversidad en cuanto al tipo de mutaciones identificadas, pero la distribución de los tipos de mutación ha sido diferente a la descrita en la literatura. Mientras que el 54% de las mutaciones descritas en la literatura son mutaciones de truncamiento, seguidas de las mutaciones *missense* (44.8%). En esta Tesis Doctoral, los porcentajes se invierten, de manera que las mutaciones *missense* suponen el 56.3% y las mutaciones que provocan codones de *stop* prematuros el 37.5% (Figura 37: A).

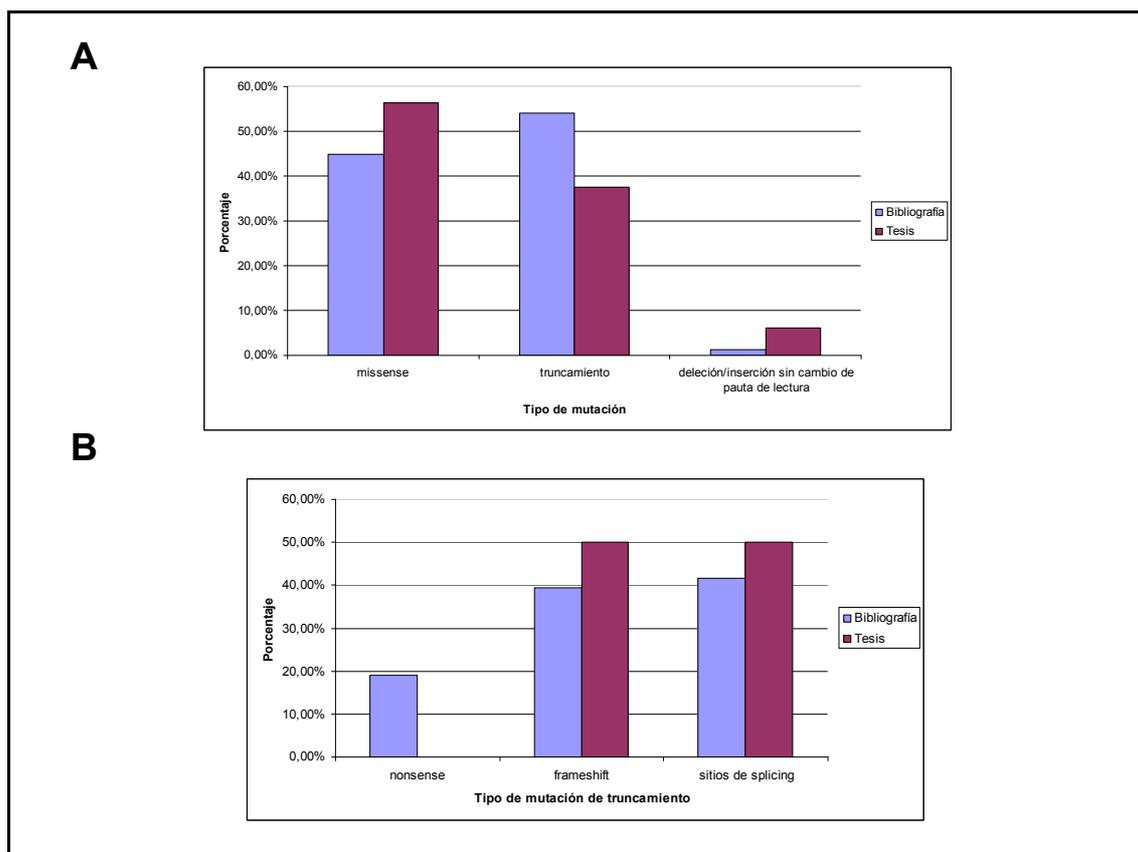


Figura 37: Distribución de mutaciones descritas en la literatura e identificadas en esta Tesis Doctoral en función de, A: el tipo de mutación (*missense*, truncamiento, deleciones o inserciones que no provocan cambio en la pauta de lectura) y, B: el tipo de mutación que provoca péptidos truncados.

Esta diferencia en la distribución de los tipos de mutación también existe cuando se analizan los resultados de los distintos autores por separado. Algunos de ellos postulan que los criterios de selección de los individuos, que conforman la cohorte, puede determinar el tipo de mutación que se va a identificar (Richard y cols., 2003; Van Driest y cols., 2004).

1.3.- Localización de las mutaciones en el gen *MyBPC3*

En esta Tesis Doctoral hemos identificado 16 mutaciones, trece de ellas están situadas en nueve de los 34 exones estudiados y las otras tres en regiones intrónicas flanqueantes (en resultados Tabla 11).

A continuación vamos a estudiar la localización de las mutaciones identificadas en este trabajo, agrupándolas según los 3 tipos de mutaciones antes definidas: mutaciones *missense*, mutaciones que provocan señales prematuras de terminación y mutaciones *in frame*.

1.3.1.- Localización por dominios de las mutaciones *missense*

Las nueve mutaciones *missense* identificadas en este trabajo se concentran en tres zonas funcionales distintas (Figura 38):

1. Dos de las mutaciones se identifican en los dominios C0 y C1 (D75N y A216T, respectivamente). Aunque existen evidencias de que estos dominios interaccionan con la actina y con la miosina, no se puede descartar que interaccionen con otras proteínas de los filamentos finos o gruesos (Flashman y cols., 2004). En concreto, el dominio C1 está localizado entre dos *linkers* (región rica en prolinas-alaninas y *MyBPC-binding*) de forma que, según las condiciones de actividad del músculo, participa en la interacción de la c-MyBPC con la región S2 de la β -miosina o en la interacción de la c-MyBPC con la actina (Govada y col., 2008). La gran cantidad de cargas negativas del extremo C-terminal del dominio C1 podría tener un papel fundamental en la localización del motivo *MyBP-C-binding* en el lugar correcto sobre la región S2 de la miosina (Govada y col., 2008).
2. Cuatro de ellas se localizan en el dominio C3 de la proteína (V471E, R495W, R502Q y E542Q). Distintos autores han propuesto que los dominios C2, C3 y C4 de la proteína son necesarios para dotar a la región N-terminal de la suficiente flexibilidad para que se produzca la interacción con la región S2 de la miosina o con el filamento de actina (Oakley y cols., 2004). Un dato que refleja la importancia de estos dominios es la alta frecuencia con la que se identifican mutaciones en algunos de los exones del dominio C3. Cardim y cols. (2005) plantean la existencia de “*hot spots*” en el exón 16 del gen *MyBPC3*. Nuestros resultados parecen evidenciar lo mismo, ya que en siete de los 20 casos índices con mutación (35%) aparece una mutación en los exones 16 ó 17, y en concreto se concentran entre los aminoácidos 471 al 542.
3. Tres de las mutaciones *missense* se identifican entre los dominios C5-C10 (T957S, R1022P y E1179K) que contribuyen al ensamblaje del filamento grueso mediante:
 - Su interacción con la cola de la β -miosina (fundamentalmente C10).
 - Su interacción con la titina (C7-C10).

- La disposición de las propias moléculas sobre el filamento grueso y las interacciones existentes entre ellas. Algunos autores proponen que las moléculas de c-MyBPC rodean al filamento grueso y que existen interacciones entre los dominios C-terminales de diferentes moléculas de c-MyBPC (Moolman-Smook y cols., 2002). Mientras que otros autores proponen que las moléculas de c-MyBPC se disponen axialmente a lo largo del esqueleto del filamento grueso (Squire y cols., 2003).

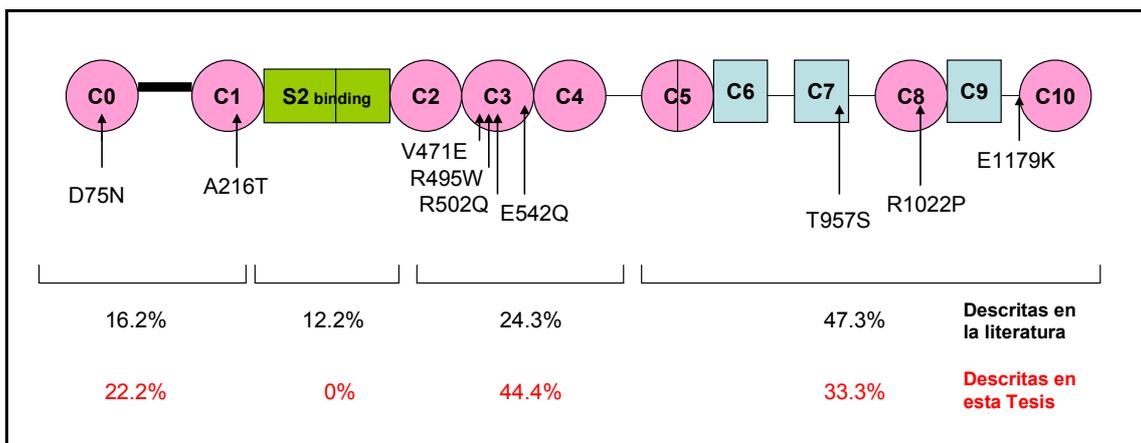


Figura 38: Frecuencia de las mutaciones *missense* en los dominios de la c-MyBP-C. Los porcentajes en negrita corresponden a mutaciones publicadas y los porcentajes en rojo representan la distribución de mutaciones *missense* en esta Tesis.

Cuando se compara la distribución por dominios funcionales de las mutaciones *missense*, identificadas en esta Tesis Doctoral, y las mutaciones descritas en la literatura, se observa que la mayoría de las mutaciones descritas en la bibliografía (47.3%) se localizan entre los dominios C5-C10, seguidas del 24.3% en los dominios C2-C4. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral (44.4%) se localizan entre los dominios C2-C4, y en concreto, están todas en el dominio C3.

1.3.2.- Localización de las mutaciones que provocan señales prematuras de terminación

Las mutaciones que provocan señales prematuras de terminación dan lugar a ARNm aberrantes que podrían ser degradados, a este nivel, por la maquinaria celular o podrían traducirse y dar lugar a péptidos truncados (Yu y cols., 1998, Nanni y cols., 2003; Ogimoto y cols., 2004; Sarikas y cols., 2005). A continuación, se describe la

localización de las mutaciones, de este tipo, que se han identificado en esta Tesis Doctoral.

1.3.2.1.- Deleciones que provocan un cambio en la pauta de lectura de los aminoácidos

Las tres mutaciones *frameshift* identificadas en este trabajo se localizan en tres dominios con funciones diferentes y podrían provocar péptidos truncados de distinta longitud:

1. La mutación Q327fs provoca un cambio en la pauta de lectura que da lugar a un codón de *stop* 21 aminoácidos más adelante, en el caso de que se llegara a traducir. La mutación se produce en el dominio *S2-binding*, dominio que está implicado en la unión de la c-MyBPC con la región S2 de la β -miosina. Además, este dominio desempeña una función reguladora pues la fosforilación/defosforilación de tres de sus residuos (S273, S282 y S302) está relacionada con la interacción miosina-actina. La mutación Q327fs se produce después de ese motivo triplemente fosforilable, pero el truncamiento en posiciones muy cercanas podría afectar a esa función de la proteína. Además, el péptido truncado carecería, si se llegase a traducir, de los dominios C2-C10.
2. La mutación K600fs produce un cambio en la pauta de lectura que conlleva la aparición de un codón de *stop* en el aminoácido siguiente al que se produce la mutación. La mutación se da en el dominio C4, que dota de flexibilidad a la molécula de c-MyBPC para que se puedan dar las interacciones β -miosina con actina. Si el péptido truncado se tradujese podría estar alterada esta flexibilidad y además faltarían los dominios C-terminales (C5-C10), que están íntimamente relacionados con la incorporación de la proteína a la banda A del sarcómero.
3. La mutación P955fs provoca un cambio en la pauta de lectura y da lugar a un codón de *stop* 94 aminoácidos después, en el caso de que se llegara a traducir. La mutación se localiza en el dominio C7, dominio relacionado con la incorporación de la c-MyBPC a la banda A del sarcómero. Si se llegara a traducir el péptido truncado carecería de los dominios C-terminales C8-C10.

Al analizar la distribución de las distintas mutaciones *frameshift*, descritas en la literatura (en resultados Tabla 11), por dominios se observa que el 89% de las mutaciones *frameshift* se producen en dominios implicados en dar flexibilidad a la proteína (C2-C4) o implicados en la incorporación de la proteína en el sarcómero (C5-C10). Siendo en estos últimos donde se concentran más del 50% de las mutaciones *frameshift* descritas. En Tesis Doctoral, dos de las tres mutaciones *frameshift* identificadas se encuentran en estos dominios, lo que supone el 66.7% de ellas.

1.3.2.2.- Cambios en los intrones que afectan a secuencias donadoras oceptoras de *splicing*

Las mutaciones que afectan a secuencias donadoras oceptoras de *splicing* alteran el corte y empalme durante la transcripción provocando aparición o eliminación de secuencias exónicas, y en definitiva, dan lugar a ARNm aberrantes.

Las tres mutaciones en los intrones identificadas en este trabajo se localizan en los intrones 6, 11 y 29, respectivamente. Dos de ellas son nuevas (IVS6+5G>A y IVS11-9G>A) y podrían provocar péptidos truncados a nivel del dominio S2-*binding*.

1.3.3.- Mutaciones que modifican el número de aminoácidos de la proteína sin desencadenar cambio de pauta en la lectura

Este tipo de mutaciones no son frecuentes en el gen *MyBPC3*, ya que representan el 1.2% de las mutaciones recogidas en la bibliografía. En concreto, sólo se han descrito dos mutaciones de este tipo y las dos suponen una delección de una lisina (1.2%): K504del está localizada en el dominio C3 y K814del está situada en el dominio C6. Una de las 16 mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral fue de este tipo (K504del) lo que supone un 6.3%.

1.4.- Frecuencia y tipos de polimorfismos en el gen *MyBPC3*

Además de las 16 mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral, se han encontrado 15 variantes adicionales. Es interesante destacar que, de los siete polimorfismos identificados que no suponen cambio de aminoácido (variantes

sinónimas), tres no aparecen recogidos en el dbSNP del *GenBank Database* (P2P, L712L, V748V). En esta primera descripción, la frecuencia de estas variantes sinónimas ha sido entre el 2-4%.

Todas las variantes, a excepción de R326Q y R820Q, se han identificado en la población sana, con una frecuencia > 0.01 . En el caso de R326Q y R820Q resulta complicado identificar si las variantes son neutrales o si por el contrario son mutaciones causantes de enfermedad, ya que aparecen con una frecuencia < 0.01 o están ausentes en los controles sanos. De hecho estas dos variantes aparecen, como variantes de efecto incierto, en la base de datos de <http://cardiogenomics.med.harvard.edu>.

R326Q se ha descrito en la literatura en controles sanos con una frecuencia superior al 0.01 y por tanto, los autores determinaron que podría tratarse de un polimorfismo (Niimura y cols., 2002; Jaaskelainen y cols., 2002). Mientras que, en otros estudios, ha estado ausente de los controles sanos y se ha relacionado con la enfermedad (Richard y cols., 2003; Morner y cols., 2003). Esta variante se ha identificado, tanto en individuos con MCH (Niimura y cols., 2002; Richard y cols., 2003; Morner y cols., 2003), como en pacientes con miocardiopatía dilatada (MCD) (Moller y cols., 2009). Su presencia, también, se ha detectado formando parte de genotipos complejos (Ingles y cols., 2005; Moller y cols., 2009) (Tabla 53).

Tabla 53: Datos poblacionales de R326Q

Referencia	Portadores cohorte/Total cohorte	Fenotipo cohorte	Portadores controles /Total controles
Niimura y cols., 2002	1/31	MCH	1/85
Jaaskelainen y cols., 2002	1/37	MCH	7/111
Richard y cols., 2003	1/197	MCH	0/100
Morner y cols., 2003	1/46	MCH	0/100
Ingles y cols., 2005	2/80	MCH	0/150
Moller y cols., 2009	2/31	MCD	0/100
Esta Tesis Doctoral	3/130	MCH	1/200
Total	11/552	MCH/MCD	9/846

Recientemente, Moller y cols. (2009) identificaron la R326Q en dos casos índice con MCD idiopática, aunque uno de ellos presentaba otra mutación en el gen *MYH7*. Los autores concluyeron que, aunque R326Q cumplía los requisitos que ellos habían

definido para mutación, los datos que existían sobre ella no eran suficientes para determinar que era la causante de la enfermedad cuando no existían otros factores genéticos o ambientales.

En la actualidad, R326Q aparece, en la base de datos dbSNP, con un porcentaje de heterocigosidad del 2.7% y, en dicha base de datos, no se recoge si tiene asociación clínica con la enfermedad, aunque el número de individuos testados para dar esta información es pequeño (Figura 39).

En esta Tesis Doctoral, R326Q se ha identificado en los casos índice de las familias H126, H175 y H73 (en esta última formando parte de un genotipo complejo) y en uno de los 200 controles sanos (Tabla 53).

Todo lo mencionado anteriormente, en relación a R326Q, parece indicar que se trata de una variante que aparece en la población sana con frecuencia baja. El posible efecto modificador de esta variante sobre pacientes con MCH o MCD requiere un estudio, especialmente diseñado, para poder determinar con exactitud esta asociación.

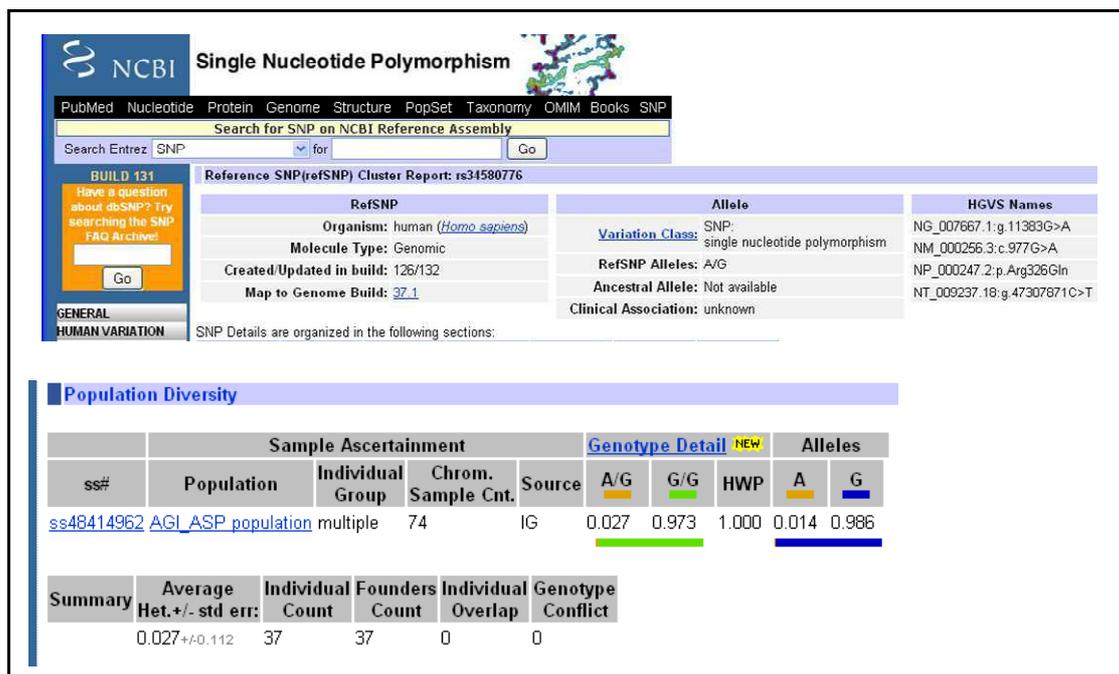


Figura 39: Diversidad en la población de la variante R326Q, según la base de datos pública *Single Nucleotide Polymorphisms* (dbSNP) del *GenBank Database*. Su identificador es rs34580776. Fecha de acceso 20/06/2010.

La variante R820Q aparece citada en la literatura como mutación (Konno y cols., 2003; Nanni y cols., 2003) y también, como polimorfismo aunque no se aportan datos de frecuencia (Alders y cols., 2003). La presencia de esta variante en un 2.4% de

una cohorte, vinculada con MCH (Konno y cols., 2003) o su identificación en compañía de una segunda mutación en *MyBPC3* (Nanni y cols., 2003) parece indicar que su pronóstico, al menos por si sola, no está claro (Tabla 54).

Tabla 54: Datos poblacionales de R820Q

Referencia	Portadores/tamaño cohorte MCH	Portador/controles sanos	Segunda mutación
Konno y cols. (2003)	8/340	0/100	-
Alders y cols. (2003)	1/22	1/100	-
Nanni y cols. (2003)	1/22	No estudio poblacional	R810H MyBPC3
Esta Tesis Doctoral	1/130	0/200	-

Esta variante aparece asociada clínicamente en dbSNP, aunque la base de datos no aporta porcentaje de heterocigosidad, ya que todos los datos de los dispone poseen arginina en la posición 820 (Figura 40).

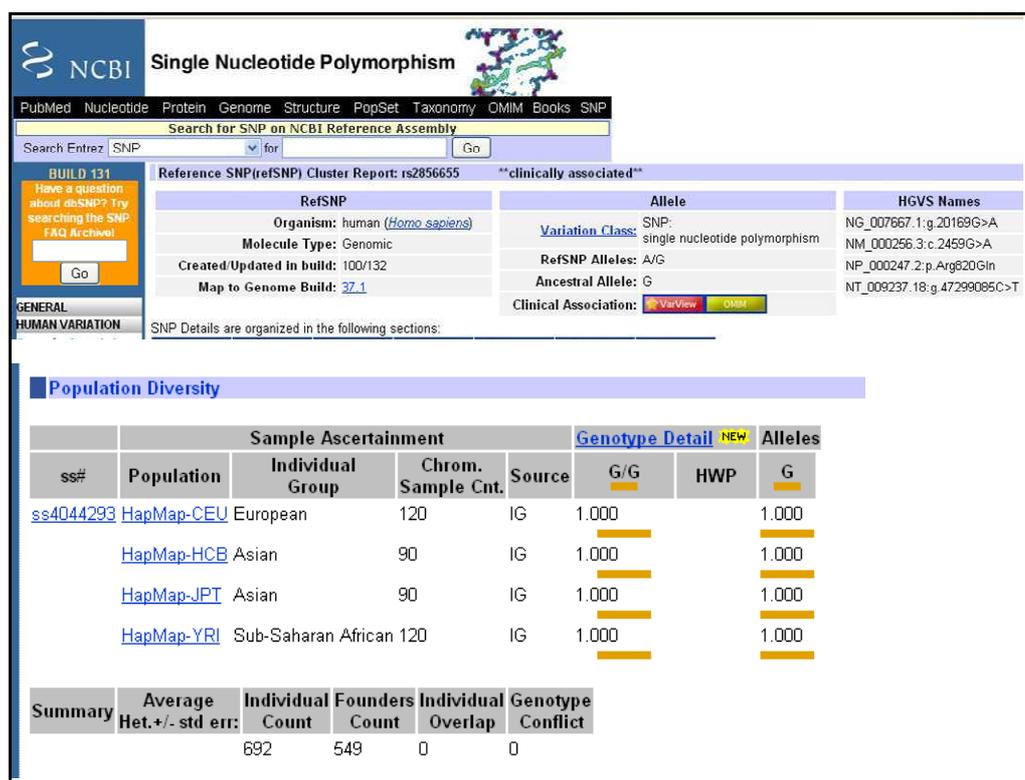


Figura 40: Diversidad en la población de la variante R820Q, según la base de datos pública *Single Nucleotide Polymorphisms* (dbSNP) del *GenBank Database*. Su identificador es rs2856655. Fecha de acceso 20/06/2010.

El cambio de R por Q en el aminoácido 820 se identificó, en esta Tesis Doctoral, en el caso índice de la familia H44 y en sus dos hijas. El paciente fue diagnosticado a

los 39 años, con hipertrofia septal asimétrica, dilatación auricular y tenía hipertensión como factor de riesgo adicional.

La presencia del cambio en uno de los 130 casos índice y en ninguno de los 200 controles sanos, de esta Tesis Doctoral, parece indicar que pudiera estar asociada con MCH o que, por lo menos, sea de efecto incierto. El hecho de que las hijas del caso índice sean portadoras de la variante y asintomáticas a los 24 años, requiere un seguimiento de ellas, en el tiempo, ya que Konno y cols. (2003) asociaron el cambio con un desarrollo tardío de la enfermedad.

Recientemente se ha descrito, en humanos, una mutación en el aminoácido 820 (R820W) que se ha asociado con MCH y no compactación cuando se presenta en homocigosis (Ripoll y cols., 2010). La mutación R820W había sido relacionada con la MCH, previamente, en gatos siameses (Meurs y cols., 2007).

Las variantes R820Q y R820W suponen un descenso considerable en la masa y un cambio de carga en el aminoácido 820. Aunque los aminoácidos resultantes siguen siendo polares y muy hidrófilicos en ambos casos. Esta similitud podría indicar que el efecto de las dos pudiera ser similar.

Por todo ello, podemos decir que aquellas variantes que aparecen con frecuencia baja en poblaciones pequeñas de controles sanos, pero que se han asociado con MCH, se podrían designar como variantes de efecto incierto. Sería necesario aportar la información clínica y genética de la que se disponga para que se pudiesen estudiar esas variantes con más profundidad, con el fin de dilucidar si se trata de variantes patogénicas o neutrales.

1.5.- Plataforma de genotipado Iplex (SEQUENOM)

La tecnología Iplex MassArray (Sequenom) se ha utilizado para el genotipado de miles de polimorfismos, con el fin de buscar marcadores de distintas enfermedades (Day y cols., 2008; Eyre y cols., 2008; Craig y cols., 2009), pero también para la detección de mutaciones conocidas y relacionadas con una determinada patología (Wright y cols., 2008). Este último caso es el que ha llevado a Health in Code S.L. a desarrollar una plataforma de genotipado que contiene 560 mutaciones de 14 genes diferentes, que se han relacionado con MCH, lo que supone el 96.5% de las mutaciones de las que teníamos información hasta el 2006. La sensibilidad y la especificidad

superan valores del 96%, lo que implica una eficiencia de la técnica del 96.95%. La probabilidad de falsos negativos es del 0.01% y de falsos positivos es del 9.09%. Es un *test* que permite analizar muchas mutaciones para muchas muestras y que puede ser útil desde el punto de vista de la prevención primaria, con el fin de detectar, en la población, a individuos susceptibles de desarrollar MCH. Su principal limitación es que detecta únicamente las mutaciones incluidas en el diseño, por lo que requiere de una ampliación constante del número de ensayos para recoger las mutaciones que se vayan identificando con el paso del tiempo.

Por tanto, dada la gran heterogeneidad genética de la MCH y el gran número de mutaciones nuevas que se describen, un resultado negativo no descarta que el individuo tenga otra mutación en alguno de esos genes. Y por ello, en esta cohorte no descarta la posibilidad de que existan mutaciones no descritas en los genes: *TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TPM1*, *ACTC*, *TTN*, *MYL2*, *MYL3*, *MYH6*, *TCAP*, *MYO6*, *MYLK2*.

2.- Análisis clínicos de la cohorte

El análisis conjunto de los parámetros clínicos evaluados en los miembros de la cohorte que se ha estudiado en esta Tesis Doctoral, y que concuerda con lo publicado en la literatura, dio como resultado que los pacientes con mutación tienen fenotipos más severos. Aunque, los distintos estudios encuentran diferencias significativas en parámetros clínicos diferentes.

En esta cohorte los pacientes con MCH, portadores de mutación en un gen sarcomérico (*MYH7* o *MyBPC3*), se diagnosticaron a edades más tempranas, presentaron con mayor frecuencia una respuesta anormal a la presión arterial, mayor grado de hipertrofia y mayor tamaño de la aurícula izquierda que aquellos en los que no se identificó mutación. Sin embargo, los resultados de Olivotto y cols. (2008) mostraron diferencias significativas en las historias familiares de MCH y MS, en los casos de fibrilación auricular y en el número de intervenciones quirúrgicas entre los portadores y no portadores de una o más mutaciones en alguno de los genes que codifican proteínas del miofilamento.

Además, al igual que otros autores (Van Driest y cols., 2004), no hemos encontrado diferencias significativas entre los pacientes con mutación en *MyBPC3* y los enfermos con mutación en *MYH7*.

Los diferentes criterios de selección de las cohortes, utilizados en los diversos estudios, pueden determinar qué parámetros clínicos resultan estadísticamente significativos. Por lo tanto, sería importante homogenizar los criterios de selección de los individuos que van a formar parte de los estudios para poder comparar los resultados obtenidos en cada uno de los estudios y si fuera el caso, llegar a criterios que facilitasen la selección de individuos potencialmente portadores de mutación.

La discusión de cada una de las mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral y su relevancia clínica se discutirá en los apartados 3.1 a 3.4.

3.- Estrategias para establecer las relaciones genotipo-fenotipo: Abordaje interdisciplinar. Patogenicidad de las mutaciones identificadas

Existen distintas herramientas que permiten abordar el estudio de una variante y predecir el efecto de una determinada mutación. Tales como:

- a) Estudio de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos implicados. Por ejemplo el cambio de carga y de hidrofobicidad que experimentan algunas mutaciones *missense* puede estar asociado con un pronóstico más severo de la enfermedad (Anan y cols., 1994; Meurs y cols., 2007).
- b) Estudio de las variantes identificadas por dominios funcionales. La patogenicidad de una mutación está íntimamente relacionada con la región funcional en la que se produce la mutación (Woo y cols., 2003). Así, el pronóstico de una mutación será distinto si se ve o no alterada la interacción entre dos proteínas.
- c) Utilización de herramientas bioinformáticas. Existen programas que, mediante diferentes algoritmos, predicen la patogenicidad de una mutación *missense* con mayor o menor fiabilidad. Y otros predicen si un cambio en un donador o aceptor puede afectar al corte-empalme.
- d) Realización de estudios funcionales. Con este tipo de ensayos se pueden sugerir los mecanismos de acción de las distintas mutaciones así como, identificar interacciones entre aminoácidos de una misma proteína o proteínas distintas. En el caso de esta Tesis Doctoral, se aporta la información que existe publicada para cada una de las mutaciones o para mutaciones que se producen en el mismo aminoácido o en aminoácidos próximos.

- e) Los estudios familiares son útiles para determinar la segregación de la mutación con la enfermedad, comprobar si una mutación ha surgido *de novo* en un individuo, plantear la existencia de un ancestro común en dos o más familias y conocer el rango de manifestación fenotípica.

A continuación, se analiza cada una de las mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral, utilizando los criterios que se han detallado anteriormente, con el fin de aportar toda la información disponible sobre la patogenicidad de las mismas.

3.1.- Patogenicidad de las mutaciones de cambio de sentido

Las mutaciones *missense* alteran el ensamblaje del sarcómero de diferente manera en las distintas mutaciones (Niimura y cols., 1998). Sin embargo, una de las principales teorías es que este tipo de mutaciones se incorporan al sarcómero y actúan como polipéptidos venenosos a través de un efecto dominante negativo (Yu y cols., 1998, Nanni y cols., 2003; Ogimoto y cols., 2004; Sarikas y cols., 2005).

A continuación se discuten las mutaciones *missense* identificadas en esta Tesis Doctoral. Para ello se han agrupado según la polaridad de los aminoácidos implicados.

3.1.1.- Mutaciones identificadas sobre aminoácidos polares ácidos (D75, E542 y E1179)

En este estudio las mutaciones identificadas sobre aminoácidos polares ácidos (D75, E542 y E1179) no supusieron cambios importantes en las propiedades fisico-químicas (masa, hidrofobicidad y polaridad) ni en la estructura secundaria, según la predicción llevada a cabo con el servidor GOR V. El resultado de los análisis *in silico* llevados a cabo con los programas Polyphen, PMut y SIFT para ver el impacto de la sustitución de un aminoácido por otro, predijeron que las mutaciones E542Q y E1179K eran benignas o neutrales. Sin embargo, la mutación D75N podría ser patogénica pues dos de los programas consideraron que lo era y aunque el resultado del tercero (PMut) determinó que el cambio era neutral, la fiabilidad de esta predicción fue baja.

3.1.1.1.- Patogenicidad de la mutación D75N

Esta Tesis Doctoral recoge la primera descripción de la mutación D75N, por lo que para el estudio de su patogenicidad únicamente se dispone de la información aportada por los estudios bioinformáticos y por el estudio familiar de H73.

Según la predicción de la estructura secundaria llevada a cabo con GOR V la sustitución no provoca cambios en dicha estructura. Además, al estudiar las distintas propiedades físico-químicas de los dos aminoácidos se observa que, aunque el cambio de aspártico por asparragina no supone variación en la polaridad, en la masa ni en la hidrofobicidad, sí se experimenta un importante cambio en la carga pasando de ser un residuo positivo ácido a uno no cargado y con un radical amino.

La mutación D75N se encuentra dentro del motivo C0. Existen algunas evidencias que describen que este motivo y/o el *linker* C0-C1 se podrían unir a la miosina y/o a la actina (Kulikovskaya y cols., 2003; Flavigny y cols., 1999; Witt y cols., 1999), aunque son necesarios más datos para poder identificar los patrones que permitirían dichas interacciones.

Dado que el motivo C0 es un motivo cardioespecífico, las mutaciones identificadas en él podrían ser importantes para el desarrollo de la enfermedad. Se han publicado, hasta el momento, 10 mutaciones en este motivo. Siete de ellas causarían péptidos truncados y sólo tres de ellas son *missense*: G5R, A31P y T59A.

La mutación G5R se ha identificado en un individuo diagnosticado de MCH y con genotipo complejo ya que presentó una segunda mutación en *MyBPC3* (R502W) (Van Driest y cols., 2004). También, se ha identificado en dos hermanos de otra familia con historia familiar de MS: el mayor no tenía hipertrofia (11 mm de grosor del VI) y el menor tenía un grosor del VI de más de 13mm (Morita y cols., 2006).

La mutación A31P se ha identificado en gatos siameses (Meurs y cols., 2005) tanto en heterocigosis como en homocigosis. Los gatos desarrollaron fenotipos que iban desde formas ligeras a hipertrofia severa, ya que algunos gatos desarrollaron insuficiencia cardíaca congestiva y otros murieron repentinamente. Los autores sugirieron que las variaciones se podrían deber al efecto dosis del gen, aunque se necesitaría un mayor número de gatos afectados para poder confirmar esta teoría.

La mutación T59A, que se produce sobre un aminoácido débilmente conservado, se identificó en un individuo que desarrolló la MCH de manera tardía (Niimura y cols., 2002).

Por tanto, el fenotipo de los portadores de mutaciones *missense*, localizadas en el dominio cardioespecífico C0, al igual que ocurre con mutaciones en otros dominios, es variable. La expresión de la enfermedad se puede dar a edades diferentes y se puede manifestar como una forma de hipertrofia suave o severa, quizás por el efecto dosis de una misma mutación o por la presencia de otras mutaciones.

En esta Tesis Doctoral, la familia H73, portadora de la mutación D75N, no presenta historia familiar de MS. La mutación se identificó en tres mujeres, de los seis miembros de la familia testados: uno con MCH (caso índice), otro con cardiopatía isquémica (II: 6) y el tercero sano (II: 7). De los tres familiares no portadores para la mutación, dos estaban sanos y el último presentaba bloqueo de rama izquierda sin hipertrofia (II: 3).

Es interesante resaltar que las tres portadoras de la mutación D75N presentaron el polimorfismo R326Q. Según algunos autores, R326Q es una variante de efecto incierto (Erdmann y cols., 2003; <http://cardiogenomics.med.harvard.edu>) que podría tener un efecto modificador sobre la mutación. Sin embargo, en nuestra familia la variante R326Q no explica la variación en el fenotipo que aparece en los tres portadores.

El análisis de los datos en conjunto, parece indicar que la influencia que puede ejercer la mutación D75N en el desarrollo de la enfermedad es incierta. Por un lado, el análisis *in silico* ha determinado que la mutación es patogénica y además se encuentra localizada en un dominio cardioespecífico que interacciona con otras proteínas sarcoméricas. Pero, por otra parte, los resultados del estudio familiar parecen determinar que podría ser patogénica y, en todo caso, tiene penetrancia incompleta y expresión tardía. De hecho, la MCH se diagnosticó únicamente en el caso índice y a los 66 años, mientras que dos de sus hermanas, portadoras de la mutación y con edades superiores no tienen hipertrofia, hasta el momento actual.

3.1.1.2.- Patogenicidad de la mutación E542Q

La mutación E542Q fue descrita por primera vez por Carrier y cols. (1997). Esta mutación *missense*, se produce en el último nucleótido del exón 17, y por ello los autores estudiaron el efecto sobre el *splicing*, demostrando la existencia de un transcrito al que le faltaba el exón 17.

El análisis bioinformático predice que la sustitución, de un glutámico por una glutamina en el aminoácido 542, es benigna o neutral. Además, como veremos a continuación, existen datos experimentales que apoyan esta idea cuando se trata de la mutación como si fuese *missense*. Flavigny y cols. (1999) analizaron la acumulación e incorporación de la proteína al sarcómero. Para ello utilizaron un modelo *ex vivo* de cardiomiocitos fetales de rata, transfectados con plásmidos que portaban formas sin mutación de la c-MyBPC o con mutación. Sus resultados mostraron que la proteína mutante (E542Q) resultante del transcrito de tamaño normal, se acumulaba menos que la proteína salvaje, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa, y no afectaba a la estructura de los sarcómeros.

Todos estos datos sugieren que el mecanismo patogénico de la mutación E542Q se parece más al de una mutación que provoca un péptido truncado.

La información que se ha publicado, muestra que el fenotipo desarrollado por los portadores de esta mutación es variable. Charron y cols. (1998a) no encontraron diferencias significativas en el fenotipo de individuos pertenecientes a familias en las que se había identificado la E542Q y familias con mutaciones en intrones o con deleciones de exones. Se han descrito individuos de mediana edad (43 y 57 años de edad respectivamente) con diagnóstico de MCH (18 y 20 mm de grosor del septo, respectivamente), en los que se identificó la mutación E542Q, sin historia familiar de HVI ni de MS (García-Castro y cols., 2009). Por otra parte, se han identificado fenotipos severos en familias con algún miembro doblemente heterocigoto para el gen *MyBPC3* (E542Q y A851V), con un grosor de la pared del ventrículo de 34 mm y sin historia familiar de MS (Ingles y cols., 2005).

Se ha sugerido que la práctica de deporte a nivel de competición podría acelerar el desarrollo de la enfermedad y desencadenar un fenotipo más severo en los portadores de esta mutación. A este respecto, es interesante resaltar que existen datos de un nadador de élite que con 20 años se encontraba sin evidencias clínicas de MCH, aunque sí en la zona gris de la HVI (13 mm). A los 28 años mostró cambios en las dimensiones cardíacas: incremento del grosor máximo de la pared VI de 13 a 18 mm, reducción del tamaño de la cavidad de 50 a 47 mm y engrosamiento asimétrico del septo ventricular anterior. La biopsia miocárdica del VI mostró desorganización de las células del músculo cardíaco y aumento de la fibrosis intersticial (Pelliccia y cols., 2006).

En la presente Tesis Doctoral se ha identificado esta mutación en tres familias, en una de ellas con historia familiar de MS (H166). Desafortunadamente sólo disponemos de datos de una de las familias (H153) y estos no han podido demostrar la cosegregación de la mutación E542Q con la enfermedad, como única causa de ella. De hecho, hay un afectado sin mutación, pero es hermano del caso índice sólo por parte de madre y no disponemos de más datos. En este caso, podría haber una segunda mutación en la familia que explique el fenotipo.

La mutación E542Q está asociada con la MCH pero existen otros factores genéticos, como la presencia de una segunda mutación, y/o ambientales, como la práctica de deporte de competición, que influyen directamente en que la presentación de la enfermedad sea más severa y se presente a edades más tempranas.

Si tal y como parece, el efecto de la mutación E542Q es por truncamiento, se puede comparar con otras mutaciones que se producen en esa zona de *splicing*. Se han descrito 5 mutaciones en el donador del exón 17 (IVS17+1G>C, IVS17+2T>C, IVS17+4A>T y IVS17+11C>G) pero no se han publicado datos clínicos ni fenotípicos de los portadores (Brito y Madeira, 2005; Richard y cols., 2003; Ingles y cols., 2005; Erdmann y cols., 2003).

El análisis *in silico* de la variante IVS17+11C>G, que ya fue descrita como una variante de frecuencia baja y patogenicidad desconocida (Erdmann y cols., 2003) determina que no afecta al corte y empalme. Mientras que, los análisis *in silico* las mutaciones E542Q, IVS17+1G>C, IVS17+2T>C y IVS17+4A>T provocan la desaparición del donador de *splicing*, por lo que su efecto sobre la estructura de la proteína podría ser el mismo y por lo tanto, podrían dar lugar a fenotipos similares.

3.1.1.3.- Patogenicidad de la mutación E1179K

La mutación E1179K se localiza al final del *linker* C9-C10, región que sirve para liberar las tensiones generadas en los dos motivos. Esta mutación no provoca cambios en la composición de α -hélices y láminas β de la estructura secundaria de la proteína, según el servidor GOR V. Al estudiar las distintas propiedades físico-químicas de los dos aminoácidos se observa que, aunque el cambio de glutámico por lisina no supone variación en la polaridad, en la masa ni en la hidrofobicidad sí se experimenta un cambio en la carga pasando de ser un residuo positivo ácido a uno básico.

Los estudios bioinformáticos llevados a cabo con los programas Polyphen, PMut y SIFT para ver el impacto de la sustitución predijeron que el cambio era benigno o neutral.

La mutación segrega con la enfermedad en dos portadores diagnosticados de MCH y mayores de 55 años. Los cinco portadores clínicamente sanos son individuos jóvenes (20 ± 12 años) que podrían desarrollar la enfermedad a edades más tardías. Hay que destacar que no hay MS en nuestra familia.

Recientemente, se ha identificado la mutación E1179K en un caso de muerte súbita infantil (Brión y cols., 2009) como resultado de testar muestras de niños que habían sufrido este síndrome, por la plataforma de genotipado desarrollada por nuestro grupo. El niño descrito no tenía expresión morfológica de MCH y es de resaltar que no se ha descrito ningún caso de MS sin hipertrofia, como consecuencia de una mutación en *MyBPC3*. Por tanto, con alta probabilidad, esta mutación no es la causa de la MS en este niño.

Con todos los datos expuestos, parece que la presencia de esta mutación podría estar asociada con un desarrollo tardío de la enfermedad. Pero no debemos obviar que aunque esta familia no tiene antecedentes familiares de MS, dos de sus miembros fallecieron superados los 60 años, a consecuencia de un evento adverso cardiovascular no especificado pero que podría estar relacionado con la enfermedad familiar.

3.1.2.- Mutaciones en aminoácidos polares básicos (R495, R502, R1022)

Las mutaciones identificadas sobre aminoácidos polares básicos (R495, R502 y R1022) supusieron cambios importantes en las propiedades fisico-químicas de los residuos, aunque no en la estructura secundaria. Las predicciones de los análisis *in silico* para estas sustituciones difieren entre los distintos programas. Si bien parece que R495W podría ser patogénica pues Polyphen y PMut hacen sus predicciones, con una confianza alta, a favor de la patogenicidad de la sustitución. En el caso de la mutación R502Q, SIFT predice con una confianza alta que el cambio es tolerado y Polyphen predice lo contrario. Por último, Polyphen y PMut dan como patogénico el cambio de R a P en la posición 1022, aunque la fiabilidad del pronóstico hecho por PMut es baja.

3.1.2.1.- Patogenicidad de la mutación R495W

El cambio de arginina a triptófano en el aminoácido 495 supone un aumento considerable de masa y pérdida de la polaridad en esa posición, con el consecuente aumento de hidrofobicidad. La predicción obtenida de los programas Polyphen y PMut para valorar el efecto de esta sustitución fue de probablemente perjudicial o patogénica, respectivamente, y los *scores* fueron altos en ambos casos. Mientras que el programa SIFT predijo el cambio como tolerado con un *score* bajo.

Aunque en nuestro estudio no ha sido posible evaluar la cosegregación de la enfermedad con la mutación en la familia H161, existen evidencias de que mutaciones en el aminoácido 495 (R495Q, R495G, R495W), que implican cambios grandes de masa, están relacionados con la MCH.

Niimura y cols. (1998) identificaron por primera vez una mutación en el residuo 495, de arginina a glutamina. Este cambio supone un descenso significativo de masa y un cambio de carga: de positivo a no cargado, aunque el aminoácido mutado continua siendo polar y muy hidrofílico. Aunque los autores asociaron la mutación R495Q con penetrancia incompleta, desarrollo tardío y expectativas de vida larga, en algunos casos se observaron cambios espontáneos y desarrollo de MCH en individuos pasados los 40 años. En ninguna de las familias en las que se identificó la mutación R495Q había casos de MS familiar (Niimura y cols., 1998; Fokstuen y cols., 2008).

En esa misma posición 495 se ha descrito, en niños con MCH, un cambio de arginina a glicina (Morita y cols., 2008; Frisso y cols., 2009) que supone pérdida de polaridad y un cambio de masa grande. Uno de los niños era portador de dos mutaciones (*MyBPC3* R495G y *TNNI3* R141Q) (Morita y cols., 2008) y en el otro caso se observó un aumento en el grosor de la pared durante el seguimiento del paciente (Frisso y cols., 2009).

Recientemente se ha descrito la misma mutación que se ha identificado en esta Tesis Doctoral, R495W, en un deportista de 17 años que presentaba un septo de 27 mm de grosor. Aunque el estudio familiar mostró que su madre, su tío y su abuelo también eran portadores, sólo este último tenía hipertrofia (18 mm) a la edad de 85 años. El seguimiento del deportista reveló un descenso progresivo del grosor de la pared, pasando a ser el grosor septal de 19.5 mm dos años después de dejar la práctica deportiva (Martín y cols., 2009).

El resultado de los estudios bioinformáticos, así como, la información disponible de las mutaciones identificadas sobre el aminoácido R495, que suponen cambios considerables en la masa del aminoácido, coinciden al considerar el cambio como patogénico. Existen otros factores, como la práctica del deporte, que pueden acelerar el desarrollo de la enfermedad, llevando a una hipertrofia severa y parcialmente reversible en la edad joven.

3.1.2.2.- Patogenicidad de la mutación R502Q

El cambio identificado en la posición 502 supone un descenso importante de masa del aminoácido y pérdida de la carga, aunque el aminoácido mutado continua siendo polar y muy hidrofílico.

El resultado del análisis *in silico* muestra diferencias entre los tres programas utilizados. Por un lado, SIFT predice, con un *score* alto, que la sustitución de R por Q en el residuo 502 es tolerada, mientras que la predicción de Polyphen y PMut es de cambio posiblemente perjudicial (supone que afecta a la función y a la estructura de la proteína) y patológico (con fiabilidad baja), respectivamente. Además, la predicción, según el programa GOR V, es que la estructura secundaria no se ve alterada por la sustitución.

Los resultados del estudio familiar confirman la segregación de la mutación con la enfermedad en las familias H147 y H614; habiendo sido diagnosticados de MCH individuos en un rango de edad de 15-68 años.

Esta mutación (R502Q) se identificó por primera vez en 1998 (Niimura y cols., 1998) y se relacionó con penetrancia incompleta y desarrollo tardío de la enfermedad. Cardim y cols., (2005) la identificaron en una familia, en la que 5 de los 6 portadores presentaban parámetros clínicos normales y alteraciones en la función diastólica en el estudio Doppler sin datos de hipertrofia. También, ha sido identificada en casos con historia familiar de MS, con muertes probablemente relacionadas con la enfermedad (Cardim y cols., 2005; Niimura y col., 1998) y en individuos sin eventos adversos ni historia familiar de MS (Ehlermann y cols., 2008; este trabajo). Además, se han identificado mutaciones sobre el aminoácido 502, en casos de MCH acompañadas de una segunda mutación en *MyBPC3*: R502Q y G490R (Olivotto y col., 2008) o R502W y S858N (Morita y cols., 2008).

Por tanto, se puede concluir que la mutación R502Q está asociada con la MCH. Sus distintas manifestaciones fenotípicas en los diferentes portadores parecen indicar que su presencia acompañada de otros factores como, por ejemplo, la presencia de una segunda mutación, pueden intensificar su efecto.

3.1.2.3.- Patogenicidad de la mutación R1022P

El cambio de arginina a prolina en el aminoácido 1022 supone una disminución considerable de masa, pérdida de la polaridad en esa posición y aumento de hidrofobicidad. La estructura secundaria no se ve alterada por la sustitución según el programa GOR V.

El resultado del análisis bioinformático para predecir el efecto de la sustitución de una R por una P en el residuo 1022 fue diferente en los tres programas utilizados. SIFT predijo, con un *score* bajo, que la sustitución de una R por una P en el residuo 1022 era tolerada. Mientras que Polyphen y PMut dieron un resultado de probablemente perjudicial (afecta a la función y a la estructura de la proteína con alta confianza) y patológico (con fiabilidad baja), respectivamente.

En esta Tesis Doctoral la mutación R1022P se ha identificado en dos familias (H18 y H49). Ha sido posible estudiar la cosegregación de la enfermedad con la mutación en 9 miembros de la familia H49. La mutación se identificó en cuatro individuos diagnosticados de MCH. De los cinco individuos no portadores, tres estaban sanos y dos jóvenes presentaban alteraciones en el ECG sugestivas de enfermedad.

La información clínica que hay disponible en la literatura acerca de mutaciones en el aminoácido 1022 es escasa. Se han identificado dos mutaciones, R1022P y R1022S, en dos pacientes con MCH (Brito y Madeira, 2005; García-Castro y cols., 2009). En el caso de la mutación R1022S el caso índice era un joven que practicaba deporte y que tenía un septo de 25 mm a los 31 años, mientras que su madre no tenía síntomas clínicos aunque su septo era de 18 mm y era portadora de la mutación (García-Castro y cols., 2009).

Por tanto, se puede concluir que la mutación R1022P está relacionada con la MCH. El hecho de que haya no portadores, en la familia H49, con alteraciones en el ECG sugestivas de enfermedad, parece indicar que la mutación no es la única causa de enfermedad en esta familia. Los datos clínicos aportados por García-Castro y cols.

(2009) sugieren que, al igual que sucede en otras mutaciones, la presencia de mutación en este aminoácido acompañada de otros factores como, por ejemplo, una segunda mutación o la práctica del deporte, pueden provocar fenotipos más severos.

3.1.3.- Mutaciones en aminoácidos polares no cargados (T957)

La mutación, T957S, identificada sobre un aminoácido polar no cargado no supuso cambios importantes en las propiedades físico-químicas del residuo 957, ni en la estructura secundaria, ya que, tanto la treonina como la serina son aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares o hidrofílicas. Debido a sus cadenas polares estos aminoácidos pueden formar puentes de hidrógeno y por su naturaleza hidrofílica tienden a ubicarse en la región externa de la molécula de la proteína.

Según los tres programas utilizados, el resultado del análisis *in silico* determinó que el cambio era benigno.

El caso índice de la familia H120, que se estudió en esta Tesis Doctoral, se diagnosticó a los 44 años y presentó un grosor en el momento del diagnóstico de 12 mm, ECG anormal, alguna trabeculación en el ápice y hendiduras que sugerían posibilidad de no compactación. Este paciente tiene dos hijos en los que no se pudo hacer el *test* genético: una hija fenotípicamente normal y un hijo que a los 20 años presentó ECG normal, 10 mm de grosor en la pared del VI y ligera trabeculación apical.

El grupo de investigación dispone de datos de otras dos familias, H412 y H302, con esta mutación (datos no publicados).

La información que tenemos de la familia H412, hasta el momento, corresponde al caso índice. Éste tenía 77 años cuando se diagnosticó, un grosor de 20 mm, hipertrofia septal asimétrica, estenosis aórtica ligera y fibrilación auricular crónica.

En el caso de la familia H302 un padre y cuatro de sus hijos están afectados o posiblemente afectados. Sin embargo, el único que es portador de esta mutación es el padre que fue diagnosticado a los 63 años. En dos de sus hijas se observó zona trabeculada a nivel apical lateral, una de ellas con un grosor de 14 mm e hipertrofia apical y la segunda hija no tenía hipertrofia. Las dos tenían como factor de riesgo la práctica de deporte a nivel competitivo. Por todo lo mencionado anteriormente, no se puede descartar que, en la familia H302, haya otra mutación que sea la causante de la enfermedad.

Además, la mutación T957S ha sido previamente identificada, por Ehlermann y cols. (2008), en un paciente diagnosticado de MCH cuando tenía 49 años y que presentaba ECG y ECO anormales (grosor de la pared del VI de 19 mm).

Cuando se estudian en conjunto los datos disponibles para la mutación T957S, se observa que:

- No está asociada con historia familiar de MS.
- El desarrollo de la MCH en los portadores se da a edades tardías y quizás no sea, por si sola, la causante de la enfermedad.
- En dos de las familias, H302 (datos no publicados) y H120 (esta Tesis Doctoral), se han registrado zonas trabeculadas que aunque no cumplen los criterios de no compactación miocárdica podrían explicar la sobreestimación del grosor de la pared por ECO, como ya ha sido descrito para otra mutación en *MyBPC3* (R272C) (Ehlermann y cols, 2008).

Por último, el resultado del estudio poblacional mostró que aparecía en un 0.5% de la población de controles sanos, puesto que la mutación se identificó en 1 de 200 controles negativos. Por lo que podría tratarse de una variante rara que aparece en la población con frecuencia baja y efecto incierto.

3.1.4.- Mutaciones en aminoácidos no polares (A216 y V471)

La alanina y la valina poseen cadenas laterales hidrofóbicas (cadenas carbonadas simples) que no interactúan con el agua, y por lo tanto, se localizan en el interior de la molécula de proteína de la que forman parte.

Las mutaciones identificadas sobre aminoácidos no polares (A216T y V471E) supusieron cambios significativos en las propiedades físico-químicas de los residuos 216 y 471, respectivamente.

3.1.4.1.- Patogenicidad de la mutación A216T

El cambio de alanina a treonina supone diferencias en las propiedades físico-químicas del residuo 216 y cambios en la estructura secundaria, según la predicción de

GOR V. Sin embargo, el análisis bioinformático determinó, con alta confianza, que A216T era benigna según los tres programas utilizados.

El resultado del estudio familiar es insuficiente para confirmar la cosegregación de la mutación con la enfermedad. Se testó en dos miembros de la familia: el caso índice (mujer con MCH con obstrucción medioventricular y subaórtica y fisiología restrictiva) y una hermana (sana y salvaje para dicha mutación).

Aunque la familia H42 tiene antecedentes de MS familiar, esta muerte podría estar relacionada con los problemas de coagulación que padece el caso índice. Ya que éste presentó trombosis en dos ocasiones tras un reemplazo valvular mitral y finalmente se le realizó trasplante cardiaco ortotópico.

Además de los datos de la familia que forma parte de esta Tesis Doctoral (H42) nuestro grupo la ha identificado en tres familias más con MCH (datos no publicados). Dos de ellas (H392 y H718) presentan otra mutación como factor de riesgo adicional: la primera una mutación en el gen *TNNI3* (A157V) y la segunda en *MyBPC3* (E258K). En el caso de la tercera familia (H599), el caso índice presentaba ligera trabeculación a nivel apical.

Por tanto, el análisis de los resultados obtenidos para A216T sugiere que la sustitución es, al menos, de efecto incierto. Ya que:

- Podría tratarse de una variante de baja frecuencia en la población sana puesto que se identificó en 1 de los 200 controles negativos.
- El análisis bioinformático determina que el cambio es benigno
- En dos de las cuatro familias en las que se ha identificado la A216T aparece acompañado de una segunda mutación.

3.1.4.2.- Patogenicidad de la mutación V471E

Esta Tesis Doctoral recoge la primera descripción de la mutación V471E, por lo que para el estudio de su patogenicidad únicamente se dispone de la información aportada por los estudios bioinformáticos, el estudio poblacional y el estudio familiar de la familia H279.

Esta mutación está localizada sobre un aminoácido no polar y supone cambios significativos en las propiedades físico-químicas del residuo 471 y cambios en la estructura secundaria, según la predicción de GOR V. Además el análisis

bioinformático determinó, con una confianza alta, que V471E era patogénica según la predicción de Poliphen y SIFT.

El aminoácido 471 de la c-MyBP-C está muy conservado entre especies pero además, también lo está cuando se comparan las tres isoformas de MyBP-C.

La mutación estuvo ausente en los 200 controles sanos en los que se testó.

Sin embargo, los resultados del estudio familiar son insuficientes para asegurar la cosegregación de la enfermedad con la mutación, al menos en estadios tempranos. El caso índice ha sido diagnosticado con 57 años y tiene hipertensión arterial, como factor de riesgo. Una de sus dos hijas de 25 años, es portadora sana de la mutación y el único evento adverso recogido en la familia es la muerte de la madre del caso índice que murió, con menos de 40 años, debido a un ACV y de la que no disponemos de estudio genético.

Con los datos expuestos anteriormente se puede concluir que la mutación V471E podría estar asociada con un desarrollo tardío de la enfermedad o que podría no ser la causante de la misma, por si sola. Por tanto, se necesitarían más datos para poder confirmar esta asociación.

3.1.5.- Conclusiones del análisis de las mutaciones *missense*

Si analizamos todo lo que se ha expuesto sobre la patogenicidad de las mutaciones *missense*, se evidencian las dificultades para extraer conclusiones genéricas. Además, parece que está claro que asignar una mutación como causante, por si sola, de la MCH es complicado. Se necesita la integración de todos los datos existentes, que en muchas ocasiones son insuficientes. Este es el caso de las mutaciones D75N y V471E, que se han descrito por primera vez en esta Tesis Doctoral. La información de la que se dispone procede de una única familia para sendas mutaciones.

El uso de herramientas bioinformáticas como los predictores que valoran el efecto de la sustitución de un aminoácido por otro, pueden ayudar a estimar la patogenicidad de una determinada mutación *missense*. En ocasiones la predicción es diferente según el predictor utilizado, y por ello, se hace necesario el uso de varios de estos programas para una misma sustitución. Los tres predictores han determinado que cuatro de las variantes eran benignas (A216T, E542Q, T957S y E1179K) y, en el resto de mutaciones *missense* identificadas en esta Tesis Doctoral (D75N, V471E, R495W,

R502Q y R1022P), sólo dos de los tres predictores han determinado que la sustitución era patogénica.

Los resultados de los estudios familiares son fundamentales para determinar la patogenicidad de una determinada mutación. Dichos estudios pueden ser diferentes en mutaciones que han tenido una misma predicción, como ha sucedido, en esta Tesis Doctoral, con las mutaciones A216T, E542Q, T957S y E1179K para las que se predijo que eran benignas.

Dos de las variantes (A216T y T957S) son, al menos, de efecto incierto. Los tres programas bioinformáticos determinaron que los cambios eran neutrales. Los datos clínicos de los que se dispone muestran que pueden aparecer en compañía de una segunda mutación, puede no darse cosegregación de la mutación con la MCH o pueden haber sido identificadas en pacientes en los que se haya sobreestimado el grosor de la pared, debido a la presencia de zonas trabeculadas. Sin olvidar que se encontraron en la población sana con una frecuencia del 0.5%, por lo que no se puede descartar que sean variantes que aparecen en la población con frecuencia baja.

En el caso de la mutación E1179K los datos existentes son insuficientes para demostrar la cosegregación de la mutación con la MCH. Por el momento, sólo se dispone de una familia en donde los portadores mayores de 55 años desarrollaron MCH y los portadores jóvenes continúan asintomáticos.

Por último, los datos de los distintos estudios familiares de la mutación E542Q muestran que está asociada con la MCH, aunque según los tres predictores utilizados sería benigna. La explicación estaría en que E542Q se comporta como una mutación de truncamiento que afecta al donador de *splicing* del exón 17 y no como mutación *missense*. Esto deja en evidencia que aquellas mutaciones *missense* localizadas dentro de los donadores o aceptores de *splicing* se deberían de estudiar como mutaciones de truncamiento.

En el caso de determinadas mutaciones, como R495W y R502Q, se han identificado portadores en los que no se expresa, de momento, la enfermedad así como, portadores con fenotipos severos. Los fenotipos severos se dan en pacientes con factores de riesgo adicionales: presencia de una segunda mutación o práctica de deporte. Esto parece indicar, al menos en esas familias, que factores de riesgo adicionales, tanto genéticos como ambientales, intensifican el efecto de esas mutaciones.

3.2.- Patogenicidad de las mutaciones que provocan codones prematuros de *stop*

Como ya hemos visto anteriormente, las mutaciones que generan un codón de terminación prematuro incluyen a las mutaciones *nonsense*, a las mutaciones en secuencias donadoras o aceptoras de *splicing* y a las mutaciones *frameshift*. El mecanismo patogénico descrito, por muchos autores, para explicar el papel de este tipo de mutaciones es la haploinsuficiencia (Moolman y cols., 2000; Andersen y cols., 2004; Sarikas y cols., 2005; Van Dijk y cols., 2009; Jacques y cols., 2008b). Uno de los argumentos que utilizan los autores para apoyar que la haploinsuficiencia es el mecanismo causante de la enfermedad en este tipo de mutaciones es que, aunque se ha demostrado la existencia de ARNm aberrantes, no se ha podido demostrar la existencia de péptidos truncados en muestras de tejido cardiaco, procedente de individuos con MCH (Moolman y cols., 2000; Jacques y cols., 2008b). Y aunque llegasen a expresarse, lo harían en pequeñas cantidades, gracias a los mecanismos de control del ARN (Byers, 2002; Mendell y Diet, 2001). Un segundo argumento, a favor de esta teoría, es la menor cantidad de proteína cMyBPC cuantificada en las miofibrillas de tejido con mutación de truncamiento en el gen *MyBPC3* (Jacques y cols., 2008b).

Según la teoría de la haploinsuficiencia, los mecanismos celulares actúan a distintos niveles para prevenir, en último término y en el caso de este gen, que la cMyBPC mutante se incorpore al sarcómero, y por lo tanto, que no lo modifique de manera cualitativa, aunque podría producirse una deficiencia cuantitativa (Moolman y cols., 2000; Andersen y cols., 2004).

Se han propuesto, principalmente, dos vías de degradación de productos truncados:

- Vía de degradación del ARNm defectuoso (*nonsense-mediated mRNA decay*). Van Dijk y cols. (2009), al estudiar muestras procedentes de tejido cardiaco de un individuo portador de una mutación *frameshift* (P955fs), sugieren que los ARNm mutantes son degradados parcialmente por este sistema, ya que se cuantificó un 20% menos de ARNm mutante que de ARNm salvaje.
- Vía de degradación de los péptidos truncados por el sistema ubiquitin-proteosoma (SUP) (Sarikas y cols., 2005).

3.2.1.- Patogenicidad de las mutaciones *frameshift*

Las mutaciones *frameshift*, provocan un cambio en la pauta de lectura que hace que la secuencia de aminoácidos cambie con respecto a la secuencia salvaje y termine en un codón de *stop* prematuro, si se llegase a traducir.

3.2.1.1.- Patogenicidad de la mutación Q327fs

Q327fs es una mutación nueva, que si se traduce, provoca un cambio en la pauta de lectura y termina en un codón de *stop* en el aminoácido 349 (último aminoácido del exón 12). El truncamiento provocaría no sólo la pérdida del extremo C-terminal sino también, la pérdida del motivo de fosforilación LAGGRRIS, localizado entre los aminoácidos 276 a 284 y que es específico de la isoforma cardiaca. En el caso de incorporarse al sarcómero se desconoce si esta delección y su consecuente cambio de pauta puede influir en la posibilidad de que la proteína se fosforile o no y por tanto, en la interacción actina-miosina.

Los datos clínicos de los que se dispone corresponden al estudio familiar de la familia H13. La mutación se ha identificado posteriormente en otras 3 familias (H233, H245 y H743) que no forman parte del *screening* llevado a cabo para realizar esta Tesis Doctoral (datos no publicados). Además, recientemente, se ha descrito una mutación (A328fs) que produce un péptido truncado en la misma posición (García-Castro y cols., 2009).

Tres de los casos índice de las familias en donde se ha identificado la mutación Q327fs (en esta Tesis Doctoral familia H13) fueron diagnosticados después de los 55 años y uno (familia H743), que se diagnosticó a los 22 años, tiene como factor de riesgo adicional la práctica de deporte a nivel no competitivo (Tabla 55).

Los resultados de dos estudios familiares (familia H233 y familia descrita por García-Castro y cols., 2009) mostraron penetrancia incompleta porque se identificaron portadores de la mutación sanos.

En dos de las familias (H13 y H233) se han diagnosticado de MCH individuos menores de 40 años, antes de que surgieran anomalías en el ECG, gracias al estudio familiar. La hija del caso índice de la familia H13 presentó un grosor del VI de 16 mm y una de las hijas del caso índice de la familia H233 presentó un grosor del VI de 16 mm

y trabeculaciones en el *apex*. De igual forma, una de las hijas del caso índice de la familia H245 presenta hipertrofia ligera (12 mm) y trabéculas en el *apex*. Todo esto parece sugerir que es portadora de la mutación pero no se dispone de estudio genético. La presencia de la mutación confirmaría que está afectada.

Tabla 55: Casos índice de familias en las que se ha identificado la mutación Q327fs y A328fs

Mutación	Familia	Dx (años)	GPVI (mm)	ECG	FR	Referencia
Q327fs	H13	65	25	Anormal	-	Esta Tesis Doctoral
Q327fs	H233	56	15	Anormal	Hipertensión	Datos no publicados
Q327fs	H245	63	20	Anormal	Hipertensión	Datos no publicados
Q327fs	H743	22	24	Anormal	Práctica de deporte	Datos no publicados
A328fs		30	¿?	Anormal	¿?	García-Castro y cols., (2009)

Dx: edad diagnóstico, GPVI: grosor de la pared del ventrículo izquierdo, ECG: electrocardiograma, FR: factor de riesgo, -: no tiene ¿?: se desconoce.

Según nuestros datos parece que la aparición de trabeculaciones en los portadores de la mutación Q327fs se podría dar antes de que se manifieste la hipertrofia, al menos en su forma severa. De hecho, Germans y cols. (2006) sugirieron que la presencia de trabéculas podría representar una de las primeras alteraciones del miocardio en los portadores de mutación, ya que las detectaron en la pared del septo inferior del ventrículo izquierdo en portadores de mutaciones (*MyBPC3* W792fs y *TPMI* E62Q) con un grosor normal de la pared y ECG normal.

Los datos disponibles sugieren que la mutación Q327fs está asociada con el desarrollo de la MCH. El hecho de que se haya diagnosticado en tres de los cuatro casos índice (familias H13, H233 y H245) después de los 55 años y que la penetrancia no haya sido siempre completa, apunta a que el desarrollo de la enfermedad puede ser tardío, siempre que no se den otros factores de riesgo, como la práctica de deporte (caso índice de la familia H743). Además, el hecho de que se haya identificado en cuatro familias que pertenecen al mismo centro de referencia parece indicar que estas familias pudieran tener un antecedente común.

3.2.1.2.- Patogenicidad de la mutación K600fs

La mutación K600fs fue identificada por primera vez por Richard y cols. (2003) en un individuo con MCH. Esta mutación, si se traduce, provoca un cambio en la pauta de lectura de los aminoácidos que desemboca en un codón de *stop* prematuro en el aminoácido siguiente.

Los resultados del estudio familiar que aporta esta Tesis Doctoral corresponden al análisis de la familia H37. Además, la mutación se ha identificado posteriormente en otras 6 familias (H125, H373, H605, H645, H654 y H670) que no forman parte del *screening* llevado a cabo para realizar esta Tesis Doctoral (datos no publicados) (Tabla 56) pero que se sospecha que tienen un origen común. Los casos índice de 6 de las 7 familias portadoras de la mutación K600fs presentan algún factor de riesgo adicional, tal como la presencia de una segunda mutación, la práctica de deporte o la hipertensión.

En las familias H125 y H670 no se confirma la cosegregación de la mutación con la enfermedad dado que existen individuos no portadores, para la mutación o mutaciones identificadas en las familias, con sospecha de MCH (Tabla 56). Estos individuos deberían de ser reevaluados para descartar falsos positivos en el diagnóstico o casos de fenocopias.

Se han descrito dos mutaciones, S593fs y H594fs, que producen un codón de *stop* en la posición 601 al igual que la K600fs (Kubo y cols., 2005; Hirota y cols., 2006). Las dos se han asociado con el desarrollo de la MCH a edades tardías y el remodelado que sufre el VI con el paso de los años en los pacientes portadores de ellas. Los resultados de Kubo y cols. (2005), al estudiar 15 familias portadoras de una mutación que procedía de un ancestro común (S593fs), determinaron que el curso clínico de estos pacientes no era benigno a lo largo del tiempo, ya que se producía un remodelado progresivo del VI a medida que avanzaba la edad. La penetrancia de la enfermedad fue del 100% en sujetos mayores de 50 años y del 65% en menores de 50 años. Aunque, el 23% de los pacientes con MCH, la mayoría con más de 60 años, desarrollaron la enfermedad en su estadio final, es importante resaltar que cuatro de las familias presentaron antecedentes de MS (27%). Por último, Hirota y cols. (2006) sugirieron que la causa de la MCH, en pacientes mayores de 65 años, portadores de una mutación de truncamiento (H594fs) y con un ventrículo con forma de luna creciente se

debía a la presencia de ese tipo de mutaciones y, no a los cambios relacionados con la edad o con la hipertensión.

Tabla 56: Casos índice de familias en las que se ha identificado la mutación K600fs

Familia	Dx (años)	GPVI (mm)	ECG	FR adicional	Referencia	Estudio familiar Cosegregación
H37	44	25	Anormal	Deporte no competitivo	Esta Tesis Doctoral	Si
H125	21	22	Anormal	MYH7 L1591Q	Datos no publicados	No
H373	16	33	Anormal	Deporte competitivo	Datos no publicados	Si*
H605	33	19	Anormal	Deporte competitivo	Datos no publicados	Si
H645	43	25	Anormal	Hipertensión	Datos no publicados	Si*
H654	31	20	Anormal	Deporte no competitivo	Datos no publicados	-
H670	53	17	Anormal	-	Datos no publicados	No

* En las familias H373 y H645 la penetrancia es completa, siempre que la presencia de mutación va acompañada del factor de riesgo adicional. -: no estudio familiar o no FR adicional.

Dx: edad diagnóstico, GPVI: grosor de la pared del ventrículo izquierdo, FR: factor de riesgo

El análisis de los datos disponibles sugiere que la mutación K600fs está asociada con el desarrollo de la MCH. El hecho de que se haya identificado en siete familias que pertenecen al mismo centro de referencia parece indicar que se puede tratar de una mutación que procede de un ancestro común.

Aunque el desarrollo de la enfermedad se puede producir a edades superiores a los 50 años nuestros resultados ponen de manifiesto que la presencia de otros factores de riesgo, como la práctica del deporte, la presencia de una segunda mutación o la hipertensión, aceleran el desarrollo de la enfermedad, dando formas severas de la enfermedad en portadores de diferentes familias.

3.2.1.3.- Patogenicidad de la mutación P955fs

La delección de los nucleótidos CT localizados en las posiciones g18566 y 18567 de la secuencia de referencia utilizada en esta Tesis Doctoral (P955fs), fue identificada por primera vez por Niimura y cols. (1998) en una familia en la que se habían dado tres muertes relacionadas con la enfermedad. Esta mutación si se tradujera, provocaría un cambio en la pauta de lectura de los aminoácidos que desembocaría en un codón de *stop* prematuro en el aminoácido 1049. Los estudios funcionales llevados a cabo a partir de tejido cardíaco del septo del VI, en pacientes con esta mutación, demostraron la existencia de ARNm aberrante aunque su presencia era un 20% menor que en las formas sin mutación (Van Dijk y cols., 2009). Los autores no han podido demostrar la existencia de la proteína truncada aunque esto puede ser debido a que la sensibilidad de la técnica empleada (*Western immunoblotting*) no detecta cantidades menores del 1.6%. El análisis combinado de la composición y función de la proteína sarcomérica mostró contractilidad reducida en pacientes portadores de mutaciones *frameshift* y era compatible con la haploinsuficiencia, como mecanismo de la enfermedad.

En esta Tesis Doctoral, la mutación P955fs se identificó en una familia con antecedentes de MS (H160). En ella, se identificaron tres portadores (el caso índice y sus hijos), todos con anomalías en el ECG pero uno de sus hijos no ha desarrollado, con 23 años, la hipertrofia (8 mm).

De igual forma, el estudio familiar llevado a cabo, para la mutación P955fs, por Niimura y cols. (1998) determinó penetrancia incompleta pues había portadores que no habían desarrollado todavía la enfermedad, independientemente del grupo de edad al que perteneciesen.

Esta misma mutación fue identificada, también, por Pedone y cols. (2005) en 4 individuos no emparentados y que no tenían antecedentes de MS. Los autores concluyeron que este tipo de mutaciones podían dar manifestaciones clínicas severas asociadas con un amplio rango de hipertrofia. Además, la misma mutación podía conllevar tanto alto riesgo de MS como insuficiencia cardíaca severa debida a obstrucción o a disfunción diastólica.

Se ha descrito otra delección de dos nucleótidos (g18535-18536delCG) que se da 10 nucleótidos *upstream* pero que provocaría un péptido truncado en la misma posición (Anan y cols., 2002). Las dos mutaciones provocarían el truncamiento de la misma

región del extremo C-terminal y tendrían la misma secuencia de aminoácidos, a excepción de los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 945 a 955. Anan y cols. (2002) presentaron la mutación asociada a un caso de hipertrofia en el septo basal anterior, en la pared libre anterolateral y en el septo posterior del ventrículo. Además esta mutación se ha relacionado al igual que otras mutaciones de truncamiento (S297X, H594fs) con el ventrículo en forma de luna creciente del VI en portadores mayores y MCH (Hirota y cols., 2006)

En conclusión, el análisis de los datos existentes indica que la mutación P955fs está relacionada con la MCH. De la misma forma que ocurre con otras mutaciones, la expresión de la enfermedad no se da siempre en los portadores y su presencia puede llevar asociado antecedentes familiares de MS o insuficiencia cardiaca severa. El mecanismo que explica la enfermedad es la haploinsuficiencia, produciendo un remodelado del VI con el paso del tiempo.

3.2.2.- Patogenicidad de las mutaciones identificadas en secuencias donadoras o aceptoras de *splicing*

Las mutaciones localizadas sobre secuencias donadoras o aceptoras de *splicing* provocan cambios en el corte y empalme del ADN durante el procesamiento del ARN. Estos cambios pueden provocar la delección de parte de la secuencia o la inserción de parte de la secuencia intrónica. La consecuencia final será un cambio en la pauta de lectura y, finalmente la generación de un codón de *stop* prematuro, si se llegase a producir la traducción.

3.2.2.1.- Patogenicidad de la mutación IVS6+5G>A

Esta Tesis Doctoral recoge la primera descripción de la mutación IVS6+5G>A, habiendo sido identificada en homocigosis en dos pacientes con enfermedad severa. Aunque la única información de la que disponemos es el resultado del estudio familiar y la predicción obtenida de las herramientas bioinformáticas, podemos asumir que el comportamiento de esta mutación es similar al de otras mutaciones descritas (E258K y IVS6+1G>A) que se localizan sobre el mismo donador y para las que los predictores bioinformáticos predicen, con los mismos *scores*, que el *splicing* se ve afectado.

Los resultados de diferentes estudios funcionales, a partir de ARNm, demuestran la existencia de productos anormales de *splicing* para las mutaciones E258K y IVS6+1G>A (Andersen y cols., 2004; Erdmann y cols., 2001). Estos transcritos defectuosos producen, si se traducen, un cambio en la pauta de lectura, a la incorporación de aminoácidos aberrantes y, finalmente, a un codón de *stop* prematuro.

Sarikas y cols. (2005) estudiaron la expresión y localización sarcomérica de cMyBP-C, con mutaciones que provocan truncamiento a distintos niveles de la proteína, utilizando cardiomiocitos neonatales de rata infectados con adenovirus recombinantes. Los autores no encontraron diferencias entre los niveles de ARNm, pero sí en la expresión de las proteínas sin y con mutación. Los análisis densitométricos revelaron que las formas truncadas se expresaban menos que las formas sin mutación. En el caso de la E258K, que produce un truncamiento de la proteína del 80%, la expresión se reducía un 89±5%, mientras que si el truncamiento afectaba a un 3% de la proteína, la expresión se reducía un 30±4%, comparado con el tipo salvaje. Con sus resultados, demostraron que el SUP degradaba rápidamente las proteínas truncadas y además, proporcionaron evidencias de que estas proteínas mutantes podían dañar la capacidad proteolítica del propio SUP. A la luz de estos resultados, Sarikas y cols. (2005) postularon que el equilibrio celular se podría romper en el caso de que estas proteínas mutadas no fueran eliminadas correctamente. Como consecuencia de esto, se iniciaría una cardiopatía en etapas tardías de la vida, que es una característica de la MCH debida a muchas de las mutaciones en el gen *MyBPC3*.

Además, las proteínas mutantes que se expresaban, mostraron alteraciones cuando se incorporaban al sarcómero. Cuando el truncamiento afectaba a un porcentaje pequeño de la proteína, la forma mutada se incorporaba a la banda A del sarcómero, aunque en menor grado que el tipo salvaje, mientras que cuando afectaba a gran parte de la proteína, como ocurre en el caso de la mutación E258K, ésta se integraba peor en el disco Z (Sarikas y cols., 2005).

Los resultados de los estudios funcionales, llevados a cabo a partir de muestras de músculo del VI, de pacientes portadores de la mutación E258K, han demostrado una disminución de la cantidad de proteína salvaje pero, no han podido demostrar la existencia de péptidos truncados en los ensayos realizados (Carballo y cols., 2008). Por lo que estos autores se apoyaron en estos resultados para determinar que el mecanismo de la enfermedad era la haploinsuficiencia. Los ratones, con ambos alelos KO para *MyBPC3*, son viables, aunque las estriaciones pierden la alineación. Estos ratones sufren una pérdida severa de

la contractilidad cardiaca y desarrollan hipertrofia severa (Harris y cols., 2002) o miocardiopatía dilatada (McConnell y cols., 1999).

Según la información clínica y de estudios familiares, aportada por los diversos autores, el efecto de las mutaciones E258K e IVS6+1G>A es variable. Las dos han sido descritas como mutaciones fundadoras (mutación procedente de un ancestro común) en poblaciones separadas geográficamente (Girolami y cols., 2006; Olivotto y cols., 2008; Erdmann y cols., 2001), lo que parece indicar que, al menos por si sola, no se presenta con fenotipo severo a edades tempranas ya que ha permitido que los portadores lleguen a la edad reproductora.

La mutación E258K fue identificada por Niimura y cols. (1998) en 7 individuos de una familia. En la familia hubo una muerte relacionada con la enfermedad y la mutación no presentó penetrancia completa en los menores de 20 años.

Además, la mutación E258K se ha identificado en compañía de una segunda mutación en el gen *MYH7* (R694C y K865R) formando parte de genotipos complejos pero también, se la ha relacionado con eventos de MS (Hofman y cols., 2007; Olivotto y cols., 2008). Dentro de este último caso se encuentran nuestros resultados, pues hemos identificado la mutación IVS6+5G>A en homocigosis (genotipo complejo), en una familia (H56) con dos MS (Ortiz y cols., 2009) y en la que hay antecedentes de consanguinidad.

De igual manera, en portadores de la mutación IVS6+1G>A, se han descrito casos con un desarrollo severo de la hipertrofia a edades tempranas, de forma que fue necesaria alguna intervención antes de los 30 años (ablación trascoronaria, miectomía o implantación de un desfibrilador, respectivamente) en los tres hijos de una mujer que presentaba un fenotipo menos severo que ellos (Erdmann y cols., 2001).

Por tanto, el análisis de los datos recogidos para la mutación IVS6+5G>A indica que es una mutación asociada a la MCH, que puede presentarse con penetrancia incompleta cuando se presenta en heterocigosis, pero también con fenotipos severos en individuos jóvenes cuando lo hace en homocigosis o acompañada de otras mutaciones.

3.2.2.2.- Patogenicidad de la mutación IVS11-9G>A

Esta Tesis Doctoral recoge la primera descripción de la mutación IVS11-9G>A, por lo que para el estudio de su patogenicidad se dispone de la información aportada por

los estudios bioinformáticos y los estudios familiares de las familias H110 (esta Tesis) y H606 (datos no publicados). En este caso, tres de los predictores de sitios de *splicing* (NNSplice, SSF y ASSP) no reconocen el aceptor salvaje del intrón 11. Sin embargo, la secuencia mutante ha sido identificada como aceptor, con mayor *score* que el aceptor salvaje por el programa HSF (58.23 vs. 87.17) y en el programa NetGene2 no se observaron cambios entre la secuencia salvaje y la mutante. Niimura y cols. (1998) describieron otra mutación en este aceptor, IVS11-2A>G, asociada con MCH y que, según el programa NetGene 2, afecta al *splicing*.

El resultado del estudio familiar de H110 determinó la presencia de MCH en los dos miembros estudiados y que eran portadores de la mutación. El caso índice era una mujer joven, con ECG anormal, con enfermedad del sistema de conducción y que tenía como factor de riesgo adicional, la práctica de deporte no competitivo. Mientras que su padre, diagnosticado como consecuencia del estudio familiar, tenía hipertrofia, ECG normal y no practicaba deporte. Posteriormente, nuestro grupo identificó esta mutación en dos miembros de la familia H606 (datos no publicados). Mientras que un hombre había sido diagnosticado a los 30 años, con un grosor de la pared del VI de 28 mm y ECG anormal, su hermana estaba por el momento sana.

La mutación IVS11-2A>G se ha identificado en individuos con MCH y con historias familiares de MS o al menos relacionadas con la enfermedad. Niimura y cols. (1998) la identificaron en dos familias cuyos miembros menores de 20 años no presentaban la enfermedad, pero sí la presentaban el 69% de los portadores mayores de 20 años. Posteriormente, se identificó en otra familia en donde el caso índice era un hombre joven y cuya madre se detectó gracias al estudio familiar (Ehlermann y cols., 2008).

Los datos familiares de la mutación IVS11-9G>A parecen indicar que puede estar asociada con la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad se puede dar en individuos jóvenes, probablemente, favorecidos por la existencia de otros factores de riesgo, así como en individuos más mayores. Esta conclusión es similar a la que se extrae de la otra mutación que se ha descrito en este aceptor, IVS11-2A>G. Sin embargo, esta comparación debe hacerse con cuidado porque, según los datos de los predictores bioinformáticos, no está claro que afecte al *splicing*, por lo que es necesaria la realización del estudio funcional con ARNm para confirmar la existencia o no de transcritos aberrantes.

3.2.2.3.- Patogenicidad de la mutación IVS29+5G>A

La mutación IVS29+5G>A fue descrita por Yu y cols. (2005) durante el *screening* del gen *MyBPC3*, en pacientes con MCH. Esta mutación afecta al donador de *splicing* del exón/intrón 29, según la predicción de tres de los programas bioinformáticos utilizados (SSF, NetGene2 y HSF).

La única información clínica de la que se dispone es la referente al estudio familiar de la familia H131. Se trata de una familia con MS asociada en la que se ha identificado la mutación en el caso índice y en sus dos hijas, una con MCH y la otra sana. Aunque el caso índice tenía un grosor de 41 mm y anomalías en el ECG cuando se diagnosticó a los 45 años, ninguna de sus hijas presentó anomalías en el ECG, en el momento de iniciar el seguimiento. Una de ellas, se diagnosticó gracias al estudio familiar y a la segunda hija, recientemente, se le han detectado anomalías en su ECG. Aunque en la familia hay dos casos de MS, pueden no ser debidos únicamente a la presencia de la mutación IVS29+5G>A ya que pertenecen a dos ramas distintas de la familia y no tenemos noticia de que haya consanguinidad. Además, es de resaltar que los tres miembros de la familia estudiados presentan obesidad como factor de riesgo adicional.

Todos estos datos parecen indicar que la mutación IVS29+5G>A está relacionada con el desarrollo de la enfermedad y que, anomalías en el ECG se podrían producir antes de que se manifieste la hipertrofia. No es la primera vez que se detectan, en portadores de mutaciones de truncamiento, anomalías en el ECG antes de que se produzca el aumento de grosor (Maron y cols., 2001). Aunque se ha asociado la adolescencia con el incremento sustancial en el grosor de la pared, hay individuos que presentan una progresión rápida de la hipertrofia durante la edad adulta. Este hecho sugiere la posibilidad de que factores ambientales, como el embarazo, el deporte, la obesidad, entre otros, puedan desencadenar la aparición de hipertrofia. Esto explicaría la diferencia de edad con que se manifiesta la enfermedad en los portadores.

3.2.3.- Conclusiones del análisis de las mutaciones que provocan codones prematuros de *stop*

El análisis conjunto de las mutaciones de truncamiento, utilizando los datos de los estudios familiares, permite observar que la expresión de la enfermedad se produce a edades diferentes, aún considerando la misma mutación y dentro de la misma familia.

Parece que el mecanismo por el que se produce la enfermedad en este tipo de mutaciones, es la haploinsuficiencia o el desequilibrio que se genera, con el paso del tiempo, cuando los péptidos truncados dañan el SUP. Pero, aunque el incremento sustancial en el grosor de la pared se suele dar en la adolescencia, el hecho de que haya portadores que desarrollen la hipertrofia más tarde, sugiere que la respuesta hipertrófica puede verse influida por algún factor ambiental como la práctica de deporte, el embarazo, la obesidad, entre otros, y esto explicaría por qué la enfermedad se produce a edades diferentes entre los portadores.

Aunque el diagnóstico en alguno de estos portadores se da después de los 50 años, como ha ocurrido con los casos índices de las familias H13, H641 y H166, también se han diagnosticado casos de hipertrofia, con un grosor de la pared de 20-28 mm entre los 21-36 años (familias H56, H110 y H160). Muchas veces las mutaciones vienen acompañadas de la presencia de algún factor de riesgo adicional en los portadores, tal como la presencia de una mutación en homocigosis, presencia de una segunda mutación, de práctica de deporte o de hipertensión. Parece que la presencia de alguno de estos factores acelera el desarrollo de la enfermedad, tal y como pasa en las familias H56 y H110 de esta Tesis y familia H743 (datos del grupo no publicados).

Los estudios familiares han permitido diagnosticar MCH en individuos antes de que surgieran las anomalías en el ECG. Tres de ellos, con MCH ligera y menores de 40 años pertenecientes a las familias H13, H233 y H131.

Además, en los portadores de estas mutaciones se encuentran antecedentes familiares de MS (familias H160, H56, H131 y H166) o insuficiencia cardiaca severa (caso índice de la familia H131).

3.3.- Patogenicidad de la mutación *in frame* K504del

La mutación K504del es una mutación descrita (Richard y cols., 2003) que provoca la delección de una lisina pero, no altera el resto de la secuencia de aminoácidos de la proteína (delección *in frame*). La mutación se produce en el dominio C3, en una zona donde hay 2 lisinas consecutivas. La falta de una de ellas podría afectar a la flexibilidad que se necesita para que sea posible la interacción de la región N-terminal con la región S2 de la miosina o con el filamento de actina, pero se requiere un estudio funcional para comprobarlo.

A pesar de tratarse de una mutación descrita, no existe mucha información sobre ella. Richard y cols. (2003) la identificaron en un individuo con MCH, aunque no se llegaron a aportar datos clínicos de este caso índice. Posteriormente, Cardim y cols. (2005) la identificaron en un hombre joven, con hipertrofia severa que no presentaba historia familiar de síncope ni de MS.

Nuestro grupo dispone de la información del estudio familiar de la familia H46 y de dos familias identificadas con posterioridad (H276 y H712 - datos no publicados), ninguna de las tres con antecedentes de MS. El estudio de la familia H46, realizado en esta Tesis Doctoral, determinó que la mutación K504del presentaba penetrancia incompleta de la MCH, independientemente de la edad. De los tres portadores identificados, el caso índice y su padre habían sido diagnosticados de MCH a los 35 y 59 años, respectivamente, mientras que su hermana estaba sana a los 48 años.

Además, como ya se ha mencionado antes, se ha identificado esta misma mutación en otras dos familias, H276 y H712 (datos no publicados), en sendos individuos diagnosticados a los 66 años y 16 años, respectivamente. Ambos pacientes presentaban factores de riesgo asociados: en el caso de la familia H276, el caso índice practicaba deporte no competitivo y era hipertenso, y el caso índice de la familia H712 practicaba deporte no competitivo.

Se ha descrito otra mutación *in frame* (K814del) localizada en una zona donde hay 4 lisinas consecutivas, en el dominio C6 de la proteína. Esta mutación ha sido identificada, tanto en individuos con historia familiar de MS (Ehlermann y cols., 2008) como sin ella (Cardim y cols., 2005). En ocasiones con una cosegregación dudosa con el fenotipo (Jaaskelainen y cols., 2002) y a la que se ha atribuido la haploinsuficiencia como mecanismo de la enfermedad (Andersen y cols., 2004)

El análisis de los datos disponibles indica que la mutación K504del se ha identificado en varias ocasiones en pacientes con MCH. Algunos fueron diagnosticados pasados los 50 años pero, también se ha identificado en jóvenes de 16 y 21 años. El mecanismo de la enfermedad, quizás sea la haploinsuficiencia, aunque la expresión de la enfermedad podría verse acelerada, influida por factores ambientales como la práctica del deporte o la hipertensión.

Con respecto a las mutaciones *in frame* se puede concluir que son mutaciones poco frecuentes en el gen *MyBPC3* y deben ser estudiadas de manera individual.

3.4.- Mutaciones en el gen *MyBPC3* y fenotipos severos de MCH

Aunque en los primeros estudios las mutaciones en el gen *MyBPC3* se asociaron con baja penetrancia, desarrollo tardío y curso benigno de la enfermedad (Niimura y cols., 1998 ; Charron y cols., 1998) esta idea se ha modificado en el transcurso de los años. Recientemente, ha aumentado el número de publicaciones en las que se describen casos que desarrollan la enfermedad de manera temprana (Morita y cols., 2008; Kaski y cols., 2008) o con mal pronóstico en edades avanzadas (Kubo y cols., 2005).

En esta Tesis Doctoral se muestran casos con hipertrofia severa y temprana en los portadores de las siguientes mutaciones:

- Dos portadores de la mutación R502Q: uno con 20 mm de grosor y al que se le ha practicado una miectomía con 42 años y otro caso con 36 mm a los 15 años.
- Dos portadores de la mutación P955fs: un caso con 28 mm a los 36 años y una mujer de 16 años con 21 mm.

De hecho, cuando se reúnen los datos de nuestras familias y los de estudios previos se observa que hay portadores de determinadas mutaciones (R495W, R502Q, E542Q, K600fs, P955fs) que se diagnostican a edades tempranas y tienen un grosor por encima de la media (Tabla 57). Además, entre jóvenes portadores de algunas mutaciones se identificaron algunos casos con fibrilación auricular (K600fs, R1022P, IVS6+5G>A) y otros han requerido cirugía cuando eran jóvenes (R502Q y IVS6+5G>A).

La severidad de algunas mutaciones en el gen *MyBPC3* se pone de manifiesto por la presencia de casos de MS. Las familias estudiadas en esta Tesis Doctoral, asociadas con MS, son portadoras de mutaciones que provocan transcritos aberrantes (E542Q, P955fs, IVS6+5G>A, IVS29+5G>A).

Tabla 57: Correlación genotipo-fenotipo en mutaciones previamente descritas

Mutación	R495W	R502Q	K504del	E542Q	K600fs	P955fs	R1022P
Nº de portadores (MCH/sanos)	5 (3/2)	23 (17/6)	6 (5/1)	18 (16/0)	3 (3/0)	19 (15/4)	6 (6/0)
Nº de no portadores (MCH/sanos)	0	10 (0/10)	2 (0/2)	11 (1/10)	3 (0/3)	9 (0/9)	5 (2/3)
Nº de controles	400	350	450	550	200	400	200
Edad media de diagnóstico de MCH (rango)	51 (17-85)	44 (15-81)	38 (21-59)	45 (16-53)	47 (44-50)	25 (16-36)	42 (21-67)
Grosor medio de la pared (rango)	23 (18-28)	22 (10-37)	19 (9-34)	23 (17-34)	22 (19-25)	23 (8-35)	18 (14-28)
Nº de MS/Nº de familias	0/2	1/7	0/3	2/12	0/2	4/4	0/3
Otros eventos	-	-	2 ACV (2 muertes)	1 ACV (1 muerte)	2 ACV (1 muerte)	-	-
Referencias	[1,2]	[2,3,4,5,6]	[2,7,8]	[2,9,7,10,5,11,12,13,14]	[2,7]	[2,3,7,11]	[2,15]

ACV: accidente cerebrovascular. MCH: miocardiopatía hipertrófica. MS: muerte súbita

Referencias: García-Castro y cols., 2009 [1], **Esta Tesis Doctoral** [2], Niimura y cols., 1998 [3], Cardim y cols., 2005 [4], Olivotto y cols., 2008 [5], Morita y cols., 2008 [6], Richard y cols., 2003 [7], Cardim y cols., 2005 [8], Carrier y cols., 1997[9], Ingles y cols., 2005 [10], Van Driest y cols., 2004 [11], Charron y cols., 1998a [12], Charron y cols., 1998b [13], Flavigny y cols., 1999 [14], Brito y Madeira, 2005 [15]

* En los artículos donde se citan A216T, S957T, E1179K, IVS29+5G>A no se aportan datos clínicos.

3.4.1.- Influencia de genotipos complejos sobre el fenotipo

En los 130 casos índice que forman parte del estudio de esta Tesis se han identificado dos individuos con genotipo complejo, uno con una mutación en homocigosis en *MyBPC3*: IVS6+5G>A, y otro con dos mutaciones en *MYH7*: R787H y

I736T (Laredo y cols., 2006), lo que supone un 1.5% de la cohorte y un 6.5% de los portadores. La frecuencia con la que otros autores identifican individuos con genotipos compuestos o doblemente heterocigotos es del 5% (Ingles y cols., 2005).

Los pacientes con genotipos complejos presentan fenotipos más severos y a edades más tempranas lo que se muestra como mayor hipertrofia en el VI y/o mayor incidencia de MS. Se ha sugerido que estos genotipos tienen un efecto de “dosis doble” que puede estar directamente relacionado con el efecto de estas mutaciones sobre la función de la proteína (Ingles y cols., 2005; Ortiz y cols., 2009). De hecho, las MS más tempranas, de este trabajo, se produjeron en dos hermanos gemelos de la familia del caso índice de la mutación IVS6+5G>A (MS a los 15 y 26 años), que probablemente fueran, también, homocigotos como el caso índice.

Por todo ello, y dada la complejidad que tiene la MCH, es necesario estudiar a los pacientes para, al menos, los principales genes sarcoméricos implicados en la enfermedad. Además es importante no detener un estudio aunque se encuentre una mutación porque existe la posibilidad de encontrar dos o más mutaciones en estos enfermos, sobre todo en aquellos con formas más severas de la enfermedad.

4.- Importancia del *screening* de mutaciones y de los estudios familiares desde el punto de vista clínico

Los clínicos son los encargados de asesorar a los pacientes y a las familias que tienen una enfermedad genética o que tienen el riesgo de padecerla. Los pacientes deben recibir información acerca de su enfermedad para que puedan tomar decisiones informadas.

La MCH, como ya se ha dicho anteriormente, es una enfermedad con una gran heterogeneidad clínica y genética, con múltiples variantes todas ellas infrecuentes (más de 600 mutaciones en más de 11 genes asociados con la enfermedad), hechos que complican su diagnóstico y la evaluación pronóstica (Van Driest y cols., 2004; Marian y Roberts, 1995; Spirito y cols., 1997).

El *screening* de mutaciones en genes, como *MyBPC3*, que codifican proteínas del sarcómero permite identificar la causa específica de la enfermedad en pacientes con diagnóstico clínico establecido de MCH. Se ha estimado que el 43% de las muestras, con genotipo positivo, presentan una mutación en el gen *MyBPC3* (Richard y cols., 2003), hecho que justifica la importancia de estudiar este gen. Sin embargo, dado que los portadores de mutación en *MyBPC3* pueden ser completamente asintomáticos, es posible que la presencia de mutación en este gen sea más prevalente de lo que muestran los estudios realizados.

El objetivo del *screening* de mutaciones es la identificación de mutaciones, tanto nuevas como descritas en la literatura, ya que son igualmente importantes. Es necesario proporcionar un estudio detallado de las características clínicas tanto de los casos índices como de los familiares, siempre que sea posible. La información de la que se dispone es muchas veces escasa y cualquier aportación, desde el punto de vista clínico y genético, ayuda en la toma de decisiones clínicas. Y en último término, contribuye a dar un diagnóstico diferencial.

La identificación de mutaciones, asociadas con MCH, tiene importantes consecuencias para las familias de los casos índices, porque permitirá el diagnóstico de los miembros con mayor riesgo. Los resultados de los estudios familiares, llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, confirman la gran complejidad de la enfermedad debido a la gran variabilidad fenotípica encontrada, inter- e intrafamiliar.

El análisis de los resultados obtenidos en esta Tesis y lo descrito en la literatura muestra que hay familias con una misma mutación, en las que la penetrancia y la expresión fenotípica varían considerablemente (Erdmann y cols., 2001). Pero también, es diferente la expresión de la enfermedad entre los miembros de una misma familia, sugiriendo que existen otros factores como el sexo, la actividad física, la nutrición, la etnia o el efecto de genes modificadores, que influyen en su etiología (Tanjore y cols., 2008).

Es necesario disponer de una estrategia que permita vencer las limitaciones que surgen de la heterogeneidad clínica y genética de la MCH. La mayoría de los datos surgen de estudios, a pequeña escala, realizados sobre pacientes con MCH que han sido seleccionados en base a diferentes criterios, y de los que en muchas ocasiones no se dispone de estudio familiar. Por tanto, es necesario homogenizar los criterios de selección de los pacientes que participan en los estudios y aumentar el número de

familias estudiadas, con un número más alto de miembros afectados en cada una de ellas, tanto desde el punto de vista clínico como genético.

Por último, la necesidad de un registro global de mutaciones y polimorfismos de miocardiopatías y sus fenotipos es una realidad que contribuirá a poder realizar, con mayor precisión, un análisis clínico prospectivo de la correlación genotipo-fenotipo y, en definitiva, a prevenir la MS. La comparación de fenotipos clínicos con mutaciones y polimorfismos, en las distintas familias y los estudios funcionales que se hagan, pueden proporcionar el conocimiento que falta para utilizar los datos genéticos en la clínica. Esto permitirá establecer sólidamente las relaciones genotipo-fenotipo, y por otro, este conocimiento llevará a la extensión del diagnóstico genético como una herramienta fundamental para la evaluación pronóstica de los afectados. Para que esto sea una realidad y se traduzca en una auténtica medicina individualizada se necesita la colaboración estable de grupos multidisciplinarios.

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral hemos realizado el *screening* de mutaciones en 15 genes relacionados con la MCH, en 130 pacientes diagnosticados de dicha enfermedad y que habían sido analizados, previamente, por SSCP para el gen *MYH7*. El *screening* del gen *MyBPC3*, mediante SSCP, y posterior confirmación, por secuenciación, de los fragmentos con movilidad anormal ha permitido la detección de mutaciones en este gen. Además, estas muestras se analizaron mediante una plataforma de genotipado con dos objetivos: 1) Validar la plataforma, sirviendo de controles para los genes *MYH7* y *MyBPC3* y 2) realizar el *screening* de mutaciones conocidas en otros 13 genes. Por último, con el fin de establecer la relación genotipo-fenotipo se han utilizado herramientas bioinformáticas y realizado estudios familiares.

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se concluye:

- 1) El 15.4% de la cohorte tiene una mutación en el gen *MyBPC3*. Esto supone que el 23.8% de la población en estudio tiene, al menos, una mutación en uno de los dos principales genes asociados con MCH (*MYH7* y *MyBPC3*).
- 2) Los resultados obtenidos para estos 130 casos índices, en relación a los genes *MYH7* y *MyBPC3*, muestran que la plataforma de genotipado es un método con una sensibilidad y una especificidad cercana al 97%. La plataforma de genotipado produjo un 1.03% de falsos negativos y un 9.09% de falsos positivos.
- 3) El análisis de los polimorfismos identificados mostró que todos, a excepción de R326Q y R820Q, aparecían en controles sanos con una frecuencia superior al 1%. Los datos existentes indican que R326Q se trata de una variante con baja frecuencia en la población y R820Q es una variante de efecto incierto.
- 4) El 6.1% de los portadores de mutación, en la cohorte estudiada en esta Tesis Doctoral, presenta un genotipo complejo y su fenotipo es más severo que aquellos que presentan una única mutación. De ahí la importancia de no detener los análisis cuando se encuentra, en un gen determinado, una mutación.

5) La localización de las mutaciones *missense* juega un papel importante en la patogenicidad de las mismas. La región comprendida entre los aminoácidos 471-502 es un *hot spot* dentro de la c-MyBPC ya que, en esta cohorte, el 35% de los portadores de mutación en el gen *MyBPC3* presentaron una mutación *missense* en esa zona del dominio C3.

6) Los portadores de las mutaciones *missense* identificadas en esta Tesis Doctoral, pueden permanecer asintomáticos a pesar de presentar hipertrofia del VI. El desarrollo de la enfermedad sobreviene a edades tardías cuando la presencia de la mutación no va acompañada de otros factores de riesgo, tales como, la presencia de otra mutación, práctica de deporte y la obesidad, entre otros.

7) Los resultados de los estudios familiares determinan que las predicciones del efecto de la sustitución de un aminoácido por otro son fiables cuando, al menos, dos de los tres predictores determinan el mismo efecto. Como es el caso, en esta Tesis Doctoral, de las mutaciones R495W, R502Q, R1022P, A216T y T957S.

8) Es importante estudiar el efecto sobre el *splicing* de las mutaciones *missense* que se localizan en los sitios donadores o aceptores, como es el caso, en esta Tesis Doctoral, de la mutación E542Q.

9) Las historias familiares de MS se describieron en familias portadoras de mutaciones de truncamiento (E542Q, P955fs, IVS6+5G>A, IVS29+5G>A) y no en portadores de mutaciones *missense*.

10) Siete de las 16 mutaciones identificadas en esta Tesis Doctoral: R502Q, R1022P, T957S, A216T, Q327fs, E542Q y K600fs, han aparecido en otras familias del mismo centro de referencia. Estas familias podrían tener un antecesor común. La existencia de una misma mutación en diferentes familias con un mismo ancestro y su segregación con la enfermedad confirma su patogenicidad.

11) La identificación de mutaciones, en pacientes con MCH y en sus familiares portadores subclínicos, es un factor esencial en la estratificación de riesgos.

12) El resultado de la integración de la información obtenida de las herramientas bioinformáticas y de los estudios familiares es fundamental para estimar la patogenicidad de las mutaciones identificadas, y en definitiva determinar qué pacientes tienen un riesgo más alto de sufrir MS.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología Molecular de la Célula*. (4ª edición). Ediciones Omega, Barcelona. 2004.

Alders M, Jongbloed R, Deelen W, van den Wijngaard A, Doevendans P, Ten Cate F, Regitz-Zagrosek V, Vosberg HP, van Langen I, Wilde A, Dooijes D, Mannens M. The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J* 2003;24(20):1848-1853.

Amato AA. Acid maltase deficiency and related myopathies. *Neurol Clin* 2000; 18(1):151-165.

Amos LA, Huxley HE, Holmes KC, Goody RS, Taylor KA. Structural evidence that myosin heads may interact with two sites on F-actin. *Nature* 1982;299(5882):467-469.

Anan R, Greve G, Thierfelder L, Watkins H, McKenna WJ, Solomon S, Vecchio C, Shono H, Nakao S, Tanaka H. Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1994;93:280-285.

Anan R, Niimura H, Minagoe S, Tei C. A novel deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene as a cause of Maron's type IV hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2002;89(4):487-488.

Andersen PS, Havndrup O, Bundgaard H, Larsen LA, Vuust J, Pedersen AK, Kjeldsen K, Christiansen M. Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosin-binding protein C (MYBPC3) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency. *European Journal of Human Genetics* 2004;12:673-677.

Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG, Seidman CE. Constitutively active AMP kinase mutations

cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2002;109(3):357-362.

Arad M, Maron BJ, Gorham JM, Johnson WH Jr, Saul JP, Perez-Atayde AR, Spirito P, Wright GB, Kanter RJ, Seidman CE, Seidman JG. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2005;352:362-372.

Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutics implications. Cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1251-1264.

Barany M., Barany K. Biochemistry of Muscle Contraction. Academic Press. 2002.

Bermingham N, Hernandez D, Balfour A, Gilmour F, Martin JE, Fisher EM. Mapping TNNC1, the gene that encodes cardiac troponin I in the human and the mouse. *Genomics* 1995;30(3):620-622.

Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJ. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics* 1996;35(1):11-23.

Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith I, Watkins H. Mutations in the gamma(2) subunit of AMPactivated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2001;10(11):1215-1220.

Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J, Weissenbach J, Vosberg H-P, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics* 1995;11:438-440.

Brión M, Allegue C, Gil R, Torres M, Santori M, Poster S, Madea B, Carracedo A. Involvement of hypertrophic cardiomyopathy genes in sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int: Genet Suppl* 2009.

Brito D, Madeira H: Malignant mutations in hypertrophic cardiomyopathy: fact or fancy? *Rev Port Cardiol* 2005;24:1137-1146.

Byers PH. Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 2002;109:3-6.

Carballo S, Copeland O, Jacques A, Livesey K, Redwood C, Watkins H, Marston S. Evidence for haploinsufficiency as the mechanism of action of MyBP-C mutations that cause HCM. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:768.

Cardim N, Perrot A, Santos S, Morgado P, Padua M, Ferreira S, Reis RP, Monteiro C, Ferreira T, Correia JM, Osterziel KJ. Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene. *Rev Port Cardiol* 2005;24(12):1463-1476.

Carrier L, Bonne G, Barend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruard C, Gary F, Labiet S, Bouhour J-B, Dubourg O, Desnos M, Hagege A, Trent RJ, Komajga M, Fiszman M, Schwartz K. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MyBP-C3) and identification of the mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1997;80:427-434.

Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, Guicheney P, Dufour C, Bercovici J, Dausse E, Berebbi-Bertrand I, Wisnewsky C, Pulvenis D, Fetler L, Vignal A, Weissenbach J, Hillaire D, Feingold J, Bouhour JB, Hagege A, Desnos M, Isnard R, Dubourg O, Komajda M, Schwartz K. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet* 1993;4:311-313.

Carrier L, Knoll R, Vignier N, Keller DI, Bausero P, Prudhon B, Isnard R, Ambroisine ML, Fiszman M, Ross J Jr, Schwartz K, Chien KR. Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovasc Res* 2004;63:293-304.

Cazorla O, Szilagyai S, Vignier N, Salazar G, Kramer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A. Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2006;69:370-380.

Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, Isnard R, Hagege A, Langlard JM, Bonne G, Richard P, Hainque B, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation* 1998a;97:2230-2236.

Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bouhour JB, Isnard R, Hagege A, Carrier L, Bonne G, Tesson F, Richard P, Hainque B, Schwartz K, Komajda M. Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in genotyped children. *Eur Heart J* 1998b;19:1377-1382.

Charron P, Villard E, Sébillon P, Laforêt P, Maisonobe T, Duboscq-Bidot L, Romero N, Drouin-Garraud V, Frébourg T, Richard P, Eymard B, Komajda M. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey. *Heart* 2004;90:842-846.

Cooper GM., *The Cell – A molecular Approach*. Ed. S. Associates. 2000.

DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases *N Engl J Med* 2003;348(26):2656-2668.

Dominguez R, Freyzon Y, Trybus KM, Cohen C. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell* 1998;94(5):559-571.

Ehlermann P, Weichenhan D, Zehelein J, Steen H, Pribe R, Zeller R, Lehrke S, Zugck C, Ivandic BT, Katus HA. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene. *BMC Med Genet* 2008;9:95.

El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, et al. Molecular determinants of altered Ca²⁺ handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2006;114:670-80.

El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43(2):223-229.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008;29(2):270-276.

Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004; 363:1881-1891.

Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, Tanis N, Dyachenko S, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2003;64(4):339-349.

Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B, Frantz E, Fleck E, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(2):322-330.

Eyre H, Akkari PA, Wilton SD, Callen DC, Baker E, Laing NG Assignment of the human skeletal muscle alpha-tropomyosin gene (TPM1) to band 15q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995;69(1-2):15-17.

Fatkin D, Graham RM. Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002;82:945-980.

Fisher AJ, Smith CA, Thoden JB, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I. X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF4-. *Biochemistry* 1995;34(28):8960-8972.

Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res* 2004;94:1279-1289.

Flavigny J, Souchet M, Sébillon P, Berrebi-Bertrand I, Hainque B, Mallet A, Bril A, Schwartz K, Carrier L. COOH-terminal truncated cardiac myosin-binding protein C mutants resulting from familial hypertrophic cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation in fetal rat cardiomyocytes. *J Mol Biol* 1999;294(2):443-456.

Fodor WL, Darras B, Seharaseyon J, Falkenthal S, Francke U, Vanin EF. Human ventricular/slow twitch myosin alkali light chain gene characterization, sequence, and chromosomal location. *J Biol Chem* 1989;264(4):2143-2149.

Fokstuen S, Lyle R, Munoz A, Gehrig C, Lerch R, Perrot A, Osterziel KJ, Geier C, Beghetti M, Mach F, Sztajzel J, Sigwart U, Antonarakis SE, Blouin JL. A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2008;29(6):879-885.

Freiburg A, Gautel M. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem* 1996;235(1-2):317-323.

Frisso G, Limongelli G, Pacileo G, Del Giudice A, Forgione L, Calabrò P, Iacomino M, Detta N, Di Fonzo LM, Maddaloni V, Calabrò R, Salvatore F. A child cohort study from southern Italy enlarges the genetic spectrum of hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2009;76(1):91-101.

Gallon C, Jacques A, Messer A, Tsang V, McKenna W, Marston S. Altered functions and post-translational modification of contractile proteins in myectomy samples from HOCM patients. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:S167.

Ganong, William F. Fisiología médica. El Manual Moderno 19^a Ed. 2004.

García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Álvarez V, Alonso B, Sainz R, Martín M, Morís C. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 y TPM1 en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(1):48-56.

García-Pavía P, Segovia J, Molano J, Mora R, Kontny F, Berged KE, Leren TP, Pulpón LA. High-Risk Hypertrophic Cardiomyopathy Associated With a Novel Mutation in Cardiac Myosin-Binding Protein C. *Rev Esp Cardiol* 2007;60(3):311-314.

Garvey JL, Kranias EG, Solaro RJ. Phosphorylation of C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem J* 1988;249(3):709-714.

Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S. Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J* 1995;14:1952-1960.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990;62(5):999-1006.

Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School. URL: <http://www.cardiogenomics.org>

Germans T, Wilde AAM, Dijkmans PA, Chai W, Kamp O, Pinto YM, van Rossum AC. Structural Abnormalities of the Inferoseptal Left Ventricular Wall Detected by Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Carriers of Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations. *JACC* 2006;48(12):2518-2523.

Gilbert R, Kelly MG, Mikawa T, Fischman DA. The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 1):101-111.

Girolami F, Olivotto I, Passerini I, Zachara E, Nistrì S, Rec F, Fantini S, Baldini K, Torricelli F, Cecchi F. A molecular screening strategy based on b-myosin heavy chain, cardiac myosin binding protein C and troponin T genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med* 2006;7:601-607.

Glavac D and Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 1993;2(5):404-414.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000;80(2):853-924.

Gollob MH, Green MS, Tang AS, Gollob T, Karibe A, Ali Hassan AS, Ahmad F, Lozado R, Shah G, Fananapazir L, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a gene responsible for familial Wolff–Parkinson–White syndrome. *N Engl J Med* 2001;344:1823-1831.

Govada L, Carpenter L, da Fonseca PC, Helliwell JR, Rizkallah P, Flashman E, Chayen NE, Redwood C, Squire JM. Crystal structure of the C1 domain of cardiac myosin binding protein-C: implications for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Biol* 2008;378(2):387-397.

Grazi E, Cintio O, Trombetta G. On the mechanics of the actin filament: the linear relationship between stiffness and yield strength allows estimation of the yield strength of thin filament in vivo. *J Muscle Res Cell Motil* 2004;25(1):103-5.

Gruen, M., Prinz, H., Gautel, M., cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett* 1999;453:254-259.

Hagège AA, Dubourg O, Desnos M, Mirochnik R, Isnard G, Bonne G, Carrier L, Guicheney P, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M. Familial hypertrophic cardiomyopathy: cardiac ultrasonic abnormalities in genetically affected subjects without echocardiographic evidence of left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J* 1998;19:490-499.

Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T. Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(19):5901-5905.

Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJ, Marston SB, van der Velden J. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil* 2008;29(6-8):189-201.

Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ Res* 2002;90(5):594-601.

Harris SP, Rostkova E, Gautel M, Moss RL. Binding of myosin binding protein-C to myosin subfragment S2 affects contractility independent of a tether mechanism. *Circ Res* 2004;95(9):930-936.

Hartzell HC, Glass DB. Phosphorylation of purified cardiac muscle C protein by purified cAMP-dependent and endogenous Ca^{2+} -calmodulindependent protein kinases. *J Biol Chem* 1984;259:15587-15596.

Hartzell HC, Titus L. Effects of cholinergic and adrenergic agonists on phosphorylation of a 165,000-dalton myofibrillar protein in intact cardiac muscle. *J Biol Chem* 1982;257(4):2111-2120.

Hirota T, Kitaoka H, Kubo T, Okawa M, Furuno T, Doi YL. Morphologic Characteristics of Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly With Cardiac Myosin-Binding Protein C Gene Mutations. *Circ J* 2006;70:875-879.

Hofman N, Tan HL, Clur SA, Alders M, van Langen IM, Wilde AA. Contribution of inherited heart disease to sudden cardiac death in childhood. *Pediatrics* 2007;120(4):e967-973.

Holmes KC and Geeves MA. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond* 2000;355:419-431.

Holthöfer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE. Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 2007;264:65-163. Review.

Houmeida A, Holt J, Tskhovrebova L, Trinick J. Studies of the interaction between titin and myosin. *J Cell Biol* 1995;131:1471-1481.

Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 1954;173(4412):971-973.

Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* 1957a;7:255-318.

Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 1954;173(4412):973-976.

Huxley HE. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J Biophys Biochem Cytol* 1957b;3(5):631-648.

Huxley AF. Mechanics and models of the myosin motor. *Philos Trans R Soc Lond* 2000;355:433-440.

Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet* 2005;42:e59.

Jääskeläinen P, Kuusisto J, Miettinen R, Kärkkäinen P, Kärkkäinen S, Heikkinen S, Peltola P, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Laakso M. Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J Mol Med* 2002;80(7):412-422.

Jacques AM, Copeland O, Messer AE, Gallon CE, King K, McKenna WJ, Tsang VT, Marston SB. Myosin binding protein C phosphorylation in normal, hypertrophic and failing human heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 2008a;45(2):209-216.

Jacques A, Hoskins AC, Kentish JC, Marston SB. From genotype to phenotype: a longitudinal study of a patient with hypertrophic cardiomyopathy due to a mutation in the MYBPC3 gene. *J Muscle Res Cell Motil* 2008b;29(6-8):239-246.

Jacques A, Messer A, Tsang V, McKenna W, Marston S. Evidence for reduced troponin I phosphorylation and altered troponin function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. 2006 biophysical society abstracts. *Biophys J* 2006;90:114a.

Jaenicke T, Diederich KW, Haas W, Schleich J, Lichter P, Pfordt M, Bach A, Vosberg HP. The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product. *Genomics* 1990;8(2):194-206.

Kabsch W, Sander C. How good are predictions of protein secondary structure?. *FEBS Lett* 1983;155(2):179-182.

Kaski JP, Syrris P, Tome M, Jenkins S, Pantazis A, Deanfield J, McKenna WJ, Elliott PM. Prevalence of sarcomeric protein gene mutations in pre-adolescent children with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2008;29(Abstract Suppl):125.

Keren A, Syrris P and McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008;5(3):158-168. Review.

Kimura A. Molecular etiology and pathogenesis of hereditary cardiomyopathy. *Circ J* 2008;72:A38-48.

Kloczkowski A, Ting K-L, Jernigan RL, Garnier J. Combining the GOR V algorithm with evolutionary information for protein secondary structure prediction from amino acid sequence. *Proteins* 2002;49:154-166.

Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Matsumura Y, Hitomi N, Yamasaki N, Furuno T, Takata J, Nishinaga M, Kimura A, Doi YL. Lifelong left ventricular remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac Myosin-binding protein C gene among Japanese. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(9):1737-1743.

Kulikovskaya I, McClellan G, Flavigny J, Carrier L, and Winegrad S. Effect of MyBP-C Binding to Actin on Contractility in Heart Muscle. *J Gen Physiol* 2003;122:761-774.

Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 2000;86(1):51-58.

Landstrom AP, Parvatiyar MS, Pinto JR, Marquardt ML, Bos JM, Tester DJ, Ommen SR, Potter JD, Ackerman MJ. Molecular and functional characterization of novel hypertrophic cardiomyopathy susceptibility mutations in TNNC1-encoded troponin C. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(2):281-8.

Laredo R, Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernández X, Rodríguez I, Cazón L, Alvariño I, Dumont C, Piñón P, Peteiro J, Bouzas B, Castro-Beiras A. Beta-myosin heavy-chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2006;59(10):1008-1018.

Lecarpentier Y, Vignier N, Oliviero P, Guellich A, Carrier L, Coirault C. Cardiac myosin-binding protein C modulates the tuning of the molecular motor in the heart. *Biophys J*. 2008;95:720–728.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principios de Bioquímica. 2ª ed. 1995, Barcelona: Ediciones Omega.

Lekanne Deprez RH, Muurling-Vlietman JJ, Hruda J, Baars MJ, Wijnaendts LC, Stolte-Dijkstra I, Alders M and van Hagen JM. Two cases of severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy caused by compound heterozygous. *J Med Genet* 2006;43(10):829-832.

Liew CC, Sole MJ, Yamauchi-Takahara K, Kellam B, Anderson DH, Lin LP, Liew JC. Complete sequence and organization of the human cardiac beta-myosin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3647-3651.

Lindhout DA, Li MX, Schieve D, Sykes BD. Effects of T142 phosphorylation and mutation R145G on the interaction of the inhibitory region of human cardiac troponin I with the C-domain of human cardiac troponin C. *Biochemistry* 2002;11;41(23):7267-7274.

Luther PK, Knupp C, Bennett P, Patel JR, Moss RL. Understanding the organisation and role of MyBP-C in striated muscle by analysis of normal and MyBPC-ko muscle. 2008 biophysical society meeting abstracts. *Biophys J* 2008;94:207a.

Macera MJ, Szabo P, Wadgaonkar R, Siddiqui MA, Verma RS. Localization of the gene coding for ventricular myosin regulatory light chain (MYL2) to human chromosome 12q23-q24.3. *Genomics* 1992;13:829-831.

MacLeod AR, Gooding C. Human hTM alpha gene: expression in muscle and nonmuscle tissue. *Mol Cell Biol* 1988;8:433-440.

Marian AJ, Roberts R. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92(5):1336-1347.

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 1995;92:785-789.

Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH 3rd, Spirito P, Ten Cate FJ, Wigle ED; American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J* 2003;24:1965-1991.

Maron BJ, Niimura H, Casey SA, Soper MK, Wright GB, Seidman JG, Seidman CE. Development of ventricular hypertrophy in adults with hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C mutations. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:315-321.

Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Proposal for contemporary strategies in families with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2125-2132.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB; American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups;

Council on Epidemiology and Prevention. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113:1807-1816.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy - a systematic review. *JAMA* 2002;287:1308-1320.

Martín M, Reguero JJ, Castro MG, Coto E, Hernández E, Carro A, Calvo D, de la Tassa CM. Hypertrophic cardiomyopathy and athlete's heart: a tale of two entities. *Eur J Echocardiogr* 2009;10:151-153.

Maruyama K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J* 1997;11:341-345.

Mathews CK. Van Hole, Ahren KG. Bioquímica. 3ª edición. Addison- Wesley. 2001.

McConnell BK, Jones KA, Fatkin D, Arroyo LH, Lee RT, Aristizabal O, Turnbull DH, Georgakopoulos D, Kass D, Bond M, Niimura H, Schoen FJ, Conner D, Fischman DA, Seidman CE, Seidman JG. Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice. *J Clin Invest* 1999;104:1235-1244.

McKenna WJ, Spirito P, Desnos M, Dubourg O, Komadja M. Experience of clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adults members of affected families. *Heart* 1997;77:130-132.

McLachlan AD, Stewart M, Smillie LB. Sequence repeats in alpha-tropomyosin. *J Mol Biol* 1975;98:281-291.

Mendell JT, Dietz HC. When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 2001;107:411-414.

Mesnard L, Logeart D, Taviaux S, Diriong S, Mercadier JJ, Samson F. Human cardiac troponin T: cloning and expression of new isoforms in the normal and failing heart. *Circ Res* 1995;76:687-692.

Messer AE, Jacques AM, Marston SB. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:247-259.

Meurs KM, Norgard MM, Ederer MM, Hendrix KP, Kittleson MD. A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. *Genomics* 2007;90:261-264.

Meurs KM, Sanchez X, David RM, Bowles NE, Towbin JA, Reiser PJ, Kittleson JA, Munro MJ, Dryburgh K, Macdonald KA, Kittleson MD. A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2005;14:3587-3593.

Mogensen J, Kruse TA, Borglum AD. Assignment of the human cardiac troponin I gene (TNNI3) to chromosome 19q13.4 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:272-273.

Møller DV, Andersen PS, Hedley P, Ersbøll MK, Bundgaard H, Moolman-Smook J, Christiansen M, Køber L. The role of sarcomere gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:1241-9.

Moolman JA, Reith S, Uhl K, Bailey S, Gautel M, Jeschke B, Fischer C, Ochs J, McKenna WJ, Klues H, Vosberg HP. A newly created splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation* 2000;101:1396-1402.

Moolman-Smook J, Flashman E, de Lange W, Li Z, Corfield V, Redwood C and Watkins H. Identification of Novel Interactions Between Domains of Myosin Binding

Protein-C That Are Modulated by Hypertrophic Cardiomyopathy Missense Mutations
Circ Res 2002;91:704-711.

Moos C, Offer G, Starr R, Bennett P. Interaction of C-protein with myosin, myosin rod and light meromyosin. *J Mol Biol* 1975;97:1-9.

Morita H, Larson MG, Barr SC, Vasan RS, O'Donnell CJ, Hirschhorn JN, Levy D, Corey D, Seidman CE, Seidman JG, Benjamin EJ. Single-gene mutations and increased left ventricular wall thickness in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2006;113:2697-2705.

Morita H, Rehm HL, Menesses A, McDonough B, Roberts AE, Kucherlapati R, Towbin JA, Seidman JG, Seidman CE. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *N Engl J Med* 2008;358:1899-1908.

Mörner S, Richard P, Kazzam E, Hellman U, Hainque B, Schwartz K, Waldenström A. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:841-849.

Murphy RT, Mogensen J, McGerry K, Bahl A, Evans A, Osman E, Syrris P, Gorman G, Farrell M, Holton JL, Hanna MG, Hughes S, Elliott PM, Macrae CA, McKenna WJ. Adenosine-monophosphate-activated-protein kinase disease mimicks hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:922-930.

Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, Frustaci A, Lanfranchi G. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:391-398.

Niimura, H, Bachinski, LL, Sangwatanaroj, S, Watkins, H, Chudley, AE, McKenna, W, Kristinsson, A, Roberts, R, Sole, M, Maron, BJ, Seidman, JG, Seidman, CE. Mutations

in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;338:1248-1257.

Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002;105:446-451.

Nyland LR, Palmer BM, Chen Z, Maughan DW, Seidman CE, Seidman JG, Kreplak L, Vigoreaux JO. Cardiac myosin binding protein-C is essential for thick-filament stability and flexural rigidity. *Biophys J*. 2009;96:3273-3280.

Oakley CE, Chamoun J, Brown LJ, Hambly BD. Myosin binding protein-C: enigmatic regulator of cardiac contraction. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2161-2166.

Oakley CE, Hambly BD, Curmi PM, Brown LJ. Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Res* 2004;14:95-110.

Obermann WM, Gautel M, Steiner F, van der Ven PF, Weber K, Fürst DO. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1996;134:1441-1453.

Obermann WM, Gautel M, Weber K, Fürst DO. Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J* 1997;16:211-220.

Obermann WM, van der Ven PF, Steiner F, Weber K, Fürst DO. Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in M-protein, a structural protein of the sarcomeric M band. *Mol Biol Cell* 1998;9:829-840.

Offer G, Moos C, Starr R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, Purification and characterization. *J Mol Biol* 1973;74:653-676.

Ogimoto A, Hamada M, Nakura J, et al. 17-year follow-up study of a patient with obstructive hypertrophic cardiomyopathy with a deletion mutation in the cardiac myosin binding protein C gene. *Circ J* 2004;68:174-177.

Okagaki T, Weber FE, Fischman DA, Vaughan KT, Mikawa T, Reinach FC. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J Cell Biol* 1993;123:619-626.

Olivotto I, Girolami F, Ackerman MJ, Nistri S, Bos JM, Zachara E, Ommen SR, Theis JL, Vaubel RA, Re F, Armentano C, Poggesi C, Torricelli F, Cecchi F: Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clinic Proceedings* 2008;83:630-638.

Ortiz MF, Rodríguez-García MI, Hermida-Prieto M, Fernández X, Veira E, Barriales-Villa R, Castro-Beiras A, Monserrat L. A homozygous MYBPC3 gene mutation associated with a severe phenotype and a high risk of sudden death in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:572-575.

Palau F. Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis. *Int J Mol Med* 2001;7(6):581-589.

Palm T, Graboski S, Hitchcock-DeGregori SE, Greenfield NJ. Disease-causing mutations in cardiac troponin T: identification of a critical tropomyosin-binding region. *Biophys J* 2001 Nov;81(5):2827-2837.

Palmer BM, Georgakopoulos D, Janssen PM, Wang Y, Alpert NR, Belardi DF, Harris SP, Moss RL, Burgon PG, Seidman CE, Seidman JG, Maughan DW, Kass DA. Role of cardiac myosin binding protein C in sustaining left ventricular systolic stiffening. *Circ Res* 2004b;94:1249-1255.

Palmer BM, McConnell BK, Li GH, Seidman CE, Seidman JG, Irving TC, Alpert NR, Maughan DW. Reduced cross-bridge dependent stiffness of skinned myocardium

from mice lacking cardiac myosin binding protein-C. *Mol Cell Biochem* 2004a;263:73-80.

Pedone C, Laat LE, Dooijes D, Kotflard MJ, Cate FJ. Malignant Clinical Profiles and Heterogeneous Morphological Pattern Associated With Two Mutations of Myosin Binding Protein C Gene in Hypertrophic Cardiomyopathy. Abstracts Cardiac Function and Heart Failure. *JACC* 2005;45(3):180A.

Pelliccia A, Di Paolo FM, Corrado D, Buccolieri C, Quattrini FM, Pisicchio C, Spataro A, Biffi A, Granata M, Maron BJ. Evidence for efficacy of the Italian national pre-participation screening programme for identification of hypertrophic cardiomyopathy in competitive athletes. *Eur Heart J* 2006;27:2196-2200.

Pohlmann L, Kroger I, Vignier N, Schlossarek S, Kramer E, Coirault C, Sultan KR, El-Armouche A, Winegrad S, Eschenhagen T, Carrier L. Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes. *Circ Res* 2007;101:928-938.

Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 1993;261:58-65.

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-2232.

Richard P, Villard E, Charron P, Isnard R. The genetic bases of cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:A79-89.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health

Organization.. International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841-842.

Ripoll Vera T, Monserrat Iglesias L, Hermida Prieto M, Ortiz M, Rodríguez García I, Govea Callizo N, Gómez Navarro C, Rosell Andreo J, Gámez Martínez JM, Pons Lladó G, Cremer Luengos D, Torres Marqués J. The R820W mutation in the MYBPC3 gene, associated with hypertrophic cardiomyopathy in cats, causes hypertrophic cardiomyopathy and left ventricular non-compaction in humans. *Int J Cardiol.* 2010 Jun 12. (en prensa).

Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, Labeit S, Franz WM, Fischer C, Vollrath B, Mall G, Dietz R, Kübler W, Katus HA. Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest* 1997;100:475-482.

Saad AD, Obinata T, Fischman DA. Immunochemical analysis of protein isoforms in thick myofilaments of regenerating skeletal muscle. *Dev Biol* 1987;119:336-349.

Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, Elliott PM Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002;105:1407-1411.

Sadayappan S, Gulick J, Osinska H, Martin LA, Hahn HS, Dorn GW II, Klevitsky R, Seidman CE, Seidman JG, Robbins J. Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation and cardiac function. *Circ Res.* 2005; 97:1156 –1163.

Sadayappan S, Osinska H, Klevitsky R, Lorenz JN, Sargent M, Molkenkin JD, Seidman CE, Seidman JG, Robbins J. Cardiac myosin binding protein C phosphorylation is cardioprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16918-16923.

Salazar LA, Hirata MH, Hirata RD Increasing the sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis of the LDLR gene mutations in brazilian patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:441-445.

Sanbe A, Gulick J, Hayes E, Warshaw D, Osinska H, Chan CB, Klevitsky R, Robbins J. Myosin light chain replacement in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1355-1364.

Sarikas A, Lucie Carrier L, Schenke C, Dolla D, Flavigny J, Lindenbergd KS, Eschenhagenc T, Zolka O. Impairment of the ubiquitin–proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovas Res* 2005;66:33-44.

Schlender KK, Bean LJ. Phosphorylation of chicken cardiac C-protein by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 1991;266:2811-2817.

Schreier T, Kedes L, Gahlmann R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. *J Biol Chem* 1990;265:21247-21253.

Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathies: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001;54:557-567.

Seiler SH, Fischman DA, Leinwand LA. Modulation of myosin filament organization by C-protein family members. *Mol Biol Cell* 1996;7:113-127.

Sen TZ, Jernigan RL, Garnie J, Kloczkowski A. GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 2005;21:2787-2788.

Solaro RJ, Van Eyk J. Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. *J mol Cell Cardiol* 1996;28:217-230.

Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997;336:775-785.

Squire JM, Luther PK and Knupp C. Structural Evidence for the Interaction of C-protein (MyBP-C) with Actin and Sequence Identification of a Possible Actin-binding Domain. *Journal of Molecular Biology* 2003;331(3):713-714.

Starr R, Offer G. The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem J* 1978;171:813-816.

Stewart M. Structural basis for bending tropomyosin around actin in muscle thin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8165-8166.

Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maéda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature* 2003;424:35-41.

Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, Brunner HG, Bertola DR, Crosby A, Ion A, Kucherlapati RS, Jeffery S, Patton MA, Gelb BD. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002;70:1555-1563.

Tong CW, Stelzer JE, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function. *Circ Res* 2008;103:974-982.

Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, Fazio VM, Di Ciommo V, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B. Correlation between PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet* 2003;40:704-708.

Tanjore RR, Rangaraju A, Kerkar PG, Calambur N, Nallari P. MYBPC3 gene variations in hypertrophic cardiomyopathy patients in India. *Can J Cardiol* 2008;24:127-130.

Tirone A, Arteaga E, Pereira Barreto AC, Krieger JE, Buck PC, Ianni BM, Mady C. Pesquisa de marcadores para os genes da cadeia pesada da β miosina cardíaca e da proteína C de ligação à miosina em familiares de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:467-472.

Tobacman LS. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol* 1996;58:447-81.

Kobayashi T, Jin L, de Tombe PP. Cardiac thin filament regulation. Review. *Pflugers Arch* 2008 Oct;457(1):37-46.

Trybus KM, Lowey S. The regulatory light chain is required for folding of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* 1988;263:16485-16492.

Vallins WJ, Brand NJ, Dabhade N, Butler-Browne G, Yacoub MH, Barton PJ. Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett* 1990;270:57-61.

VanBuren P, Waller GS, Harris DE, Trybus KM, Warshaw DM, Lowey S. The essential light chain is required for full force production by skeletal muscle myosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12403-12407.

Van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 2003;57:37-47.

Van Dijk SJ, Dooijes D, Remedios C, Michels M, Lamers JMJ, Winegrad S, Schlossarek S, Carrier L, Cate FJ, Stienen GJM, van der Velden J. Cardiac Myosin-Binding Protein C Mutations and Hypertrophic Cardiomyopathy Haploinsufficiency, Deranged Phosphorylation, and Cardiomyocyte Dysfunction. *Circulation* 2009;119:1473-1483.

Van Driest SL, Jaeger MA, Ommen SR, Will ML, Gersh BJ, Tajik AJ, Ackerman MJ. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004a;44(3):602-610.

Van Driest SL, Ommen SR, Tajik J, Gersh BJ, Ackerman MJ. Genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2005;85:463-469.

Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Myosin Binding Protein C Mutations and Compound Heterozygosity in Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004b;44:1903-1910.

Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation* 2001;104:1308-1314.

Vinkemeier U, Obermann W, Weber K, Fürst DO. The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J Cell Sci* 1993;106:319-330.

Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacCrea C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics* 1995;11:434-437.

Weisberg A, Winegrad S. Alteration of myosin cross bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:8999-9003.

Weisberg A, Winegrad S. Relation between crossbridge structure and actomyosin ATPase activity in rat heart. *Circ Res* 1998;83:60-72.

Welikson RE, Fischman DA. The C-terminal IgI domains of myosin-binding proteins C and H (MyBP-C and MyBP-H) are both necessary and sufficient for the intracellular crosslinking of sarcomeric myosin in transfected non-muscle cells. *J Cell Sci* 2002;115:3517-3526.

Wendel B, Reinhard R, Wachtendorf U, Zacharzowsky UB, Osterziel KJ, Schulte HD, Haase H, Hoehe MR, Morano I. The human beta-myosin heavy chain gene: sequence diversity and functional characteristics of the protein. *J Cell Biochem* 2000;79:566-575.

Winegrad S. Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* 1999;84:1117-1126.

Witt CC, Gerull B, Davies MJ, Centner T, Linke WA, Thierfelder L. Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. *J Mol Biol* 1999;294:443-456.

Woo A, Rakowski H, Liew JC, Zhao MS, Liew CC, Parker TG, Zeller M, Wigle ED, Sole MJ. Mutations of the beta myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy: critical functional sites determine prognosis. *Heart* 2003;89:1179-1185.

Xin B, Puffenberger E, Tumbush J, Bockoven JR, Wang H. Homozygosity for a novel splice site mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene causes severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet A* 2007;143A:2662-2667.

Yamamoto, K., Moos, C. The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles. *J Biol Chem* 1983;258:8395-8401.

Yu B, French JA, Carrier L, Jeremy RW, McTaggart DR, Nicholson MR, Hambly B, Semsarian C, Richmond DR, Schwartz K, Trent RJ. Molecular pathology of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in myosin binding protein C. *J Med Genet* 1998;35:205-210.

Yuan C, Guo Y, Ravi R, Przyklenk K, Shilkofski N, Diez R, Cole RN, Murphy AM. Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts — evidence for novel phosphorylation sites. *Proteomics* 2006;6:4176-4186.

Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 7th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders. 2005

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

- **Rodríguez-García MI**, Monserrat L, Ortiz M, Fernández X, Cazón L, Núñez L, Barriales-Villa R, Maneiro E, Veira E, Castro-Beiras A, Hermida-Prieto M. Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *BMC Med Genet.* 2010 Apr 30;11:67.

- **Rodríguez-García MI**, Monserrat L, Ortiz M, Fernández X, Cazón L, **Núñez L**, Barriales-Villa R, Maneiro E, Veira E, Castro-Beiras A, Hermida-Prieto M. En “Novel human pathological mutations.”: Novel human pathological mutations. Gene symbol: MYBPC3. Disease: Cardiomyopathy, hypertrophic *Hum Genet.* 2010 Apr;127(4):483-484.

- Martín F. Ortiz, **María I. Rodríguez-García**, Manuel Hermida-Prieto, Xusto Fernández, Elena Veira, Roberto Barriales-Villa, Alfonso Castro-Beiras y Lorenzo Monserrat. Mutación en homocigosis en el gen MYBPC3 asociada a fenotipos severos y alto riesgo de muerte súbita en una familia con miocardiopatía hipertrófica. *Rev Esp. Cardiol.* 2009;62:572-5.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy

María Isabel Rodríguez-García^{1,2}, Lorenzo Monserrat^{*1,2}, Martín Ortiz², Xusto Fernández², Laura Cazón², Lucía Núñez², Roberto Barriales-Villa², Emilia Maneiro², Elena Veira², Alfonso Castro-Beiras^{1,2} and Manuel Hermida-Prieto²

Abstract

Background: *MyBPC3* mutations are amongst the most frequent causes of hypertrophic cardiomyopathy, however, its prevalence varies between populations. They have been associated with mild and late onset disease expression. Our objectives were to establish the prevalence of *MyBPC3* mutations and determine their associated clinical characteristics in our patients.

Methods: Screening by Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCP) and sequencing of the fragments with abnormal motility of the *MyBPC3* gene in 130 unrelated consecutive HCM index cases. Genotype-Phenotype correlation studies were done in positive families.

Results: 16 mutations were found in 20 index cases (15%): 5 novel [D75N, V471E, Q327fs, IVS6+5G>A (homozygous), and IVS11-9G>A] and 11 previously described [A216T, R495W, R502Q (2 families), E542Q (3 families), T957S, R1022P (2 families), E1179K, K504del, K600fs, P955fs and IVS29+5G>A]. Maximum wall thickness and age at time of diagnosis were similar to patients with *MYH7* mutations [25(7) vs. 27(8), $p = 0.16$], [46(16) vs. 44(19), $p = 0.9$].

Conclusions: Mutations in *MyBPC3* are present in 15% of our hypertrophic cardiomyopathy families. Severe hypertrophy and early expression are compatible with the presence of *MyBPC3* mutations. The genetic diagnosis not only allows avoiding clinical follow up of non carriers but it opens new possibilities that includes: to take preventive clinical decisions in mutation carriers than have not developed the disease yet, the establishment of genotype-phenotype relationship, and to establish a genetic diagnosis routine in patients with familial HCM.

Background

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is an autosomal dominant disorder, characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, myocyte hypertrophy and disarray, and interstitial fibrosis [1,2]. It has a frequency of 0.2% in the adult population and is a major cause of sudden cardiac death (SD) in young people (< 35 years old). Ever since the first mutation in the beta myosin heavy chain (*MYH7*) gene was described as a cause of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) in 1990 [3], mutations have been identified in 11 genes that codify cardiac sarcomeric proteins [4-7]. Genes that more frequently show muta-

tions are *MYH7* and the cardiac myosin binding protein C (*MyBPC3*) on chromosomes 14 and 11, respectively. Mutations in *MyBPC3* are responsible for 15-20% of cases of familial HCM. Besides, available clinical and familial data are very scarce, making it very difficult to confirm the pathogenicity of the described mutations and to establish reliable correlations between genotype and phenotype.

Three isoforms of myosin binding protein-C are known to exist in adult muscle. The three of them have, 10 globular domains termed C1-C10, 7 of which are immunoglobulin I-like (IgI-like) domains, with the remaining three being fibronectin 3 (Fn3) domains. A conserved linker, termed the S2-binding motif, exists between domains C1 and C2. There is also a proline/alanine-rich extension N-terminal of C1. The cardiac isoform has an

* Correspondence: Lorenzo.monserrat.iglesias@sergas.es

¹ Hospital Universitario de A Coruña-Servicio Galego de Saúde (SERGAS), Instituto de Ciencias de la Salud, As Xubias s/n, A Coruña, 15006, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



additional IgI-like domain at the N-terminus (termed C0), an amino acid sequence LAGGGRRIS within the S2-binding motif, and a 28-amino acid insertion within the C5 domain [8,9]. These domains allow their interaction with other sarcomeric proteins.

The objectives of this study were first, determining the frequency and type of mutations in the *MyBPC3* gene within a range of patients with HCM previously studied for the *MYH7* [10] gene; second, describing the clinical features of the carriers; and third, analyzing the correlation between genotype and phenotype in the identified mutations.

Methods

(i) Patients

One hundred and thirty unrelated consecutive index cases from Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Spain, diagnosed with HCM according to the criteria of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases [2]. All the patients had been previously studied for mutations in *MYH7* [10]. We did a prospective follow-up which included the search for the patient's personal and family history, symptoms, physical exploration, electrocardiogram, echocardiogram, ergometry, Holter, treatments and events. The family members were invited to a check-up that included a clinical study, electrocardiogram, echocardiogram and genetic study. The clinical characteristics of this cohort had been previously described [10]. All patients and family members signed an informed consent agreement and the study was approved by the "Comité ético de investigación de Galicia". The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 2008 Declaration of Helsinki.

(ii) Genetic Study

Genomic DNA was extracted from blood anticoagulated with EDTA with the NUCLEON HT Genomic DNA Extraction Kit (Amersham Biosciences, UK). The primers were designed using reference sequence GenBank:U91629.1[11]. The whole coding sequence and the flanking intronic regions of the *MyBPC3* gene were amplified. Genetic screening was carried out through chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) of each fragment using commercial polyacrylamide gels 15/24 (T = 15%, C = 2%-GeneGel-Amersham Biosciences, UK). Each fragment was run to pH 8.3 and pH 9.0. The temperature was optimized for each pH and each fragment. Fragments with abnormal motility were sequenced using automatic sequencer CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA). To test the sensitivity of SSCP, the direct sequence analysis of the exon 12 was done for all samples and no false negative results were detected.

A variant was considered a mutation in accordance with three criteria: cosegregation with affected members in the family, absence of the mutation in 200 healthy adult controls, and the conservation of the mutated residue among species.

Moreover, the index cases were studied using Sequenom MassArray™ system where 537 genetic variants of HCM disease genes (*TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC*, *TTN*, *MYH6*, *MYLK2*, *MYO6*, *TCAP*) were detected by means of MALDI-TOF mass spectrometry after I-PLEX Gold assay (Sequenom Inc.).

(iii) In silico tools

Splice Site Score Predictions

Programs Splicesitefinder (SSF), Alternative Splice Site Predictor (ASSP), NetGene2 v2.4, and Human Splicing Finder splice site analysis (HSF) were used to check if the exon changes affected splice-enhancing sequences, and if the intron changes happened in donor or acceptor splicing sites.

Predicting Damaging Amino Acid Substitution

The substitution is predicted to affect protein function with online programs like *Polymorphism Phenotyping* (Polyphen), PMUT, and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT).

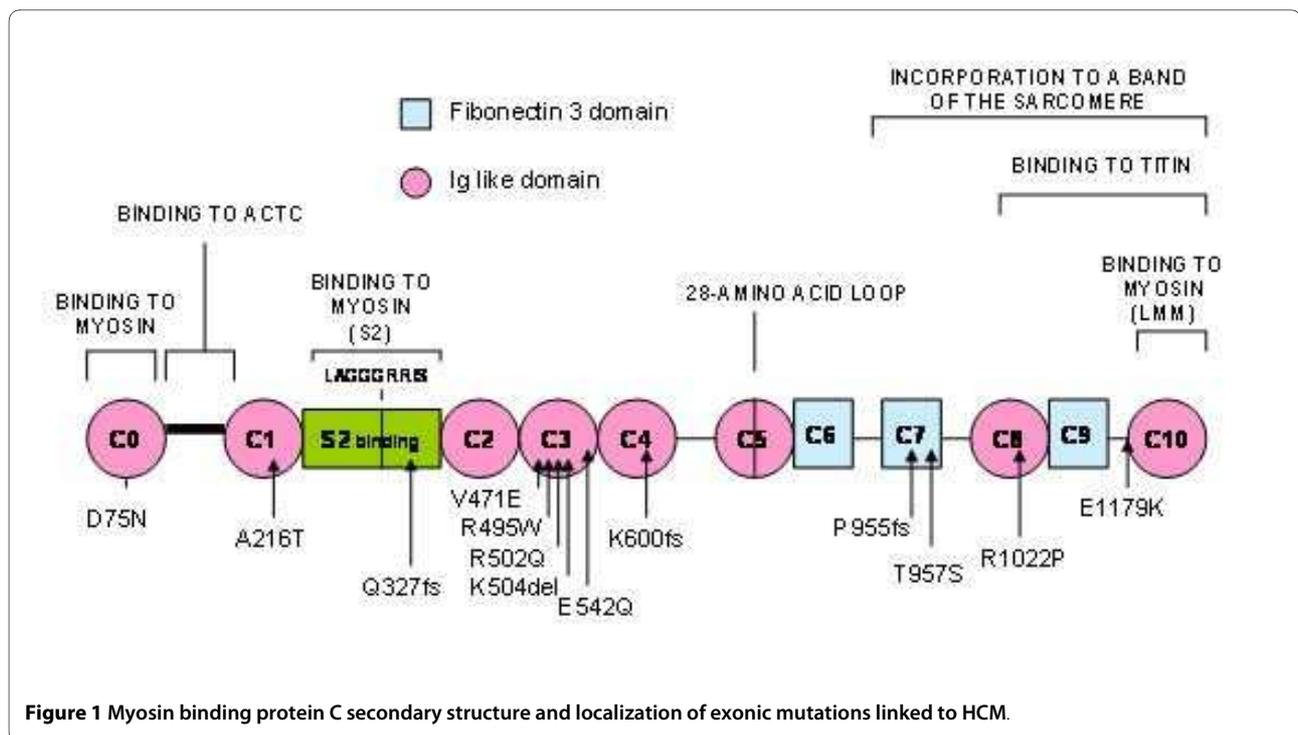
(iv) Genotype-Phenotype Correlation

A descriptive study of the phenotypical features of the mutation carriers was undertaken. These characteristics were compared with those of relatives without the mutation in order to study cosegregation and penetrance; taking into account both sex and age. Furthermore, features of the carriers were compared with those in cases with identical mutations previously described in medical literature.

Results

Sixteen mutations in *MyBPC3* were identified in 20 of the 130 index cases (15%). Thirteen mutations located in exonic regions were concentrated in 8 motives (Figure 1). Seven of them in, or near, motives implicated in myosin and/or titin binding (C0, C1, S2 binding, C7, C8 and linker C9-C10) and the rest of them in motives in which it is unknown if they establish interactions with other proteins. Three mutations (IVS6+5G>A, IVS11-9G>A and IVS29+5G>A) were located in flanking intronic regions and according to the bioinformatics can affect aberrant transcriptions.

Five of the identified mutations were novel whereas the other eleven mutations had been previously described [11-18] (Table 1). All mutations appeared in heterozygous, except for IVS6+5G>A, which showed up in homozygous as we have previously reported [19]. None of the



patients with mutations in *MyBPC3* showed mutations in *MYH7*.

Three of the sixteen identified mutations were found in more than one family (Table 1). R502Q and R1022P showed up in two families, respectively, and E542Q appeared in three of them.

(i) Comparative between the phenotype of individuals with mutation: *MyBPC3* vs. *MYH7*

There were no significant differences in maximum thickness among index cases with mutations in *MyBPC3* (25(7) mm) and *MYH7* (27(8) mm), $p = 0.16$); and age at time of diagnosis was similar (46(16) vs. 44(19) $p = 0.9$) (Table 2).

(ii) Comparative between the phenotype of individuals with and without mutation

There were significant differences in age at time of diagnosis, abnormal blood pressure response, in maximum left ventricular wall thickness and left atrial diameter between patients with mutation (in *MYH7* or *MyBPC3*) and patients without mutation (Table 2).

Index cases, with mutation were diagnosed younger ($p = 0.049$), had larger abnormal blood pressure response ($p = 0.030$), larger left ventricular wall thickness ($p = 0.001$) and larger left atrial diameter ($p = 0.038$).

Index cases with mutation had larger frequency of familial history and non-sustained ventricular tachycardia than index cases without mutation, although these differences were not significant.

(iii) Familial genetic study

A genetic study was carried out in 46 positive index cases relatives: 24 were carriers and 22 non-carriers. Out of those 24 carriers, 14 showed HCM, 4 with suggestive electrocardiographic alterations but not HCM diagnostic (H73-II:6 = D75N H197-III:4 = R502Q, H76-II:7 = K504del and H160-IV:2 = P955fs), and 6 women, ages 25 (H279-III:2 = V471E), 29 (H95-III:6 = E1179K), 32 (H95-III:2 = E1179K), 33 (H131-IV:4 = IVS29+5G>A), 49 (H46-III:4 = K504del) and 68 (H73-II:7 = D75N), were healthy carriers. Within those 22 non-carriers, 18 were considered healthy, 1 with suggestive electrocardiographic alterations (H73-II:3 = D75N), 2 probably affected (H49-IV:1 & IV:5 = R1022P) and 1 case presented HCM (H153-II:1 = E542Q).

SD as the most serious adverse event was prevalent in 5 of the 20 positive index cases. No genetic test was available for these cases. SDs occurred in 2 of 3 families with splice mutations (H56 = IV6+5G>A, H131 = IVS29+5G>A), in 1 of 3 with frameshift mutations (H160 = P955fs) and in 2 of 9 with missense mutations (H42 = A216T, H166 = E542Q).

Eight individuals of five families suffered from SD between the ages of 15 and 51.

Clinical data of the index cases and carriers can be found in Additional file 1. Figure 2 and figure 3 showed the pedigree of frameshift and splice mutations, and new missense mutations, respectively.

Table 1: Mutations in *MyBPC3* gene.

A. Missense mutations in the <i>MyBPC3</i> gene						
Fam.	Type	Mutation	Exon/ Intron	Ref seq 2920822	Pathogenicity	
H73	Missense	D75N*	E2	g 2374 G>A	likely	
H42	Missense	A216T[12]	E5	g3898G>A	uncertain	
H279	Missense	V471E*	E16	g10774T>A	likely	
H161	Missense	R495W[13]	E17	g10930C>T	likely	
H614, H147	Missense	R502Q[11]	E17	g10952G>A	likely	
H153, H641, H166	Missense	E542Q[14]	E17	g11071G>C	uncertain	
H120	Missense	T957S[15]	E27	g18572C>G	uncertain	
H49, H18	Missense	R1022P[16]	E29	g19966G>C	likely	
H95	Missense	E1179K[17]	E32	g20989G>A	uncertain	
B. Deletions in the <i>MyBPC3</i> gene						
Fam.	Type	Mutation	Exon/ Intron	Ref seq 2920822	Possible effect	
					Transcript	Traduction
H13	Deletion	Q327fs*	E12	g7364delG	Frameshift	Truncation (X349)
H46	Deletion	K504del[18]	E17	g10957- 9delAAG	In frame	One lost aa (X1273)
H37	Deletion	K600fs[18]	E19	g12413delA	Frameshift	Truncation (X601)
H160	Deletion	P955fs[11]	E27	g18566- 7delCT	Frameshift	Truncation (X1049)
C. Splice mutations in the <i>MyBPC3</i> gene						
Fam.	Type	Mutation	Exon/ Intron	Ref seq 2920822	Splice site prediction	
H56	Splicing	IVS6+5G>A*	I6	g5261G>A	splice error	
H110	Splicing	IVS11-9G>A*	I11	g7301G>A	splice error	
H131	Splicing	IVS29+5G>A#	I29	g20096G>A	splice error	

A: Missense mutations, B: Deletions and C: Splice mutations.

* Not previously described. #unpublished abstract (Yu et al., HUGO's 10th Human Genome Meeting, Poster 279). Fam: Family; E exon; I intron; aa: aminoacid. In missense mutations, at least two ("likely") or less than two ("uncertain") online programs (Polyphen, PMUT, SIFT) predicted a damaging effect. Splice site prediction was assessed by online programs (SSF, ASSP, NetGene2, HSF).

Discussion

This study has allowed us to identify mutation in *MyBPC3* in 15% of our index cases, whereas in *MYH7* were 8% in the same cohort [10]. As in other previous studies, the *MyBPC3* mutations are more frequently a cause of HCM than mutations in *MYH7* [18,20-23].

In our study, no family presented two mutations in *MyBPC3* or in *MyBPC3+MYH7*. However, previously we have described in this cohort a family with two mutations (R787H and I736T) in *MYH7* [10]. This provides us a 0.8% of multiple mutation cases, a lower percentage than the described in the literature (\approx 3%) [18,24,25]. As look-

Table 2: Phenotypic characteristics of the index patients.

	Without mutation (n = 97)	Mutation <i>MyBPC3</i> (n = 20)	Mutation <i>MYH7</i> (n = 13)	P (<i>MyBPC3</i> vs <i>MYH7</i>)	P (with vs without mutation)
Age at diagnosis (years)	53 (16)	46 (16)	44 (19)	0.97	0.051
Age start follow up (years)	56 (16)	49(15)	50 (18)	0.86	0.049
Males	68%	55%	38%	0.46	0.054
Family history of HCM	23%	30%	62%	0.25	0.10
Family history of sudden death	16%	15%	31%	0.21	0.42
High blood pressure	43%	40%	23%	1	0.42
NYHA initial III-IV	10.5%	10%	8%	0.60	0.74
NYHA III-IV ever	38%	50%	46%	1	0,21
Angina	60%	70%	41%	0.45	0.68
Syncope	19%	15%	27%	0.64	1
Non-sustained ventricular tachycardia	25.3%	42.1%	40%	1	0.10
Abnormal blood pressure response	10.8%	31.6%	67%	0.9	0.030
Maximum left ventricular wall thickness(mm)	22 (6)	25 (7)	27 (8)	0.16	0.001
Wall thickness ≥ 30 mm	13%	15%	39%	0.95	0.09
Shortening fraction (%)	39 (10)	39 (11)	43 (10)	0.29	0.67
Left atrial diameter (mm)	45 (7)	50 (11)	50 (14)	0.79	0.038
Gradient ≥ 30 mmHg	29%	35%	31%	1	0.89

Phenotypic characteristics of the index patients with mutations in *MYH7*, *MyBPC3* and without mutations in those genes. HCM: hypertrophic cardiomyopathy; NYHA: New York Heart Association functional class

ing for additional mutations, we also tested all patients, using a genotyping platform which included 537 known mutations in other HCM disease genes (*TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC*, *TTN*, *MYH6*, *MYLK2*, *MYO6*, *TCAP*). None of the index cases in this study had additional mutations in these genes. However, it is possible that there might be new mutations in these genes or mutations in other genes.

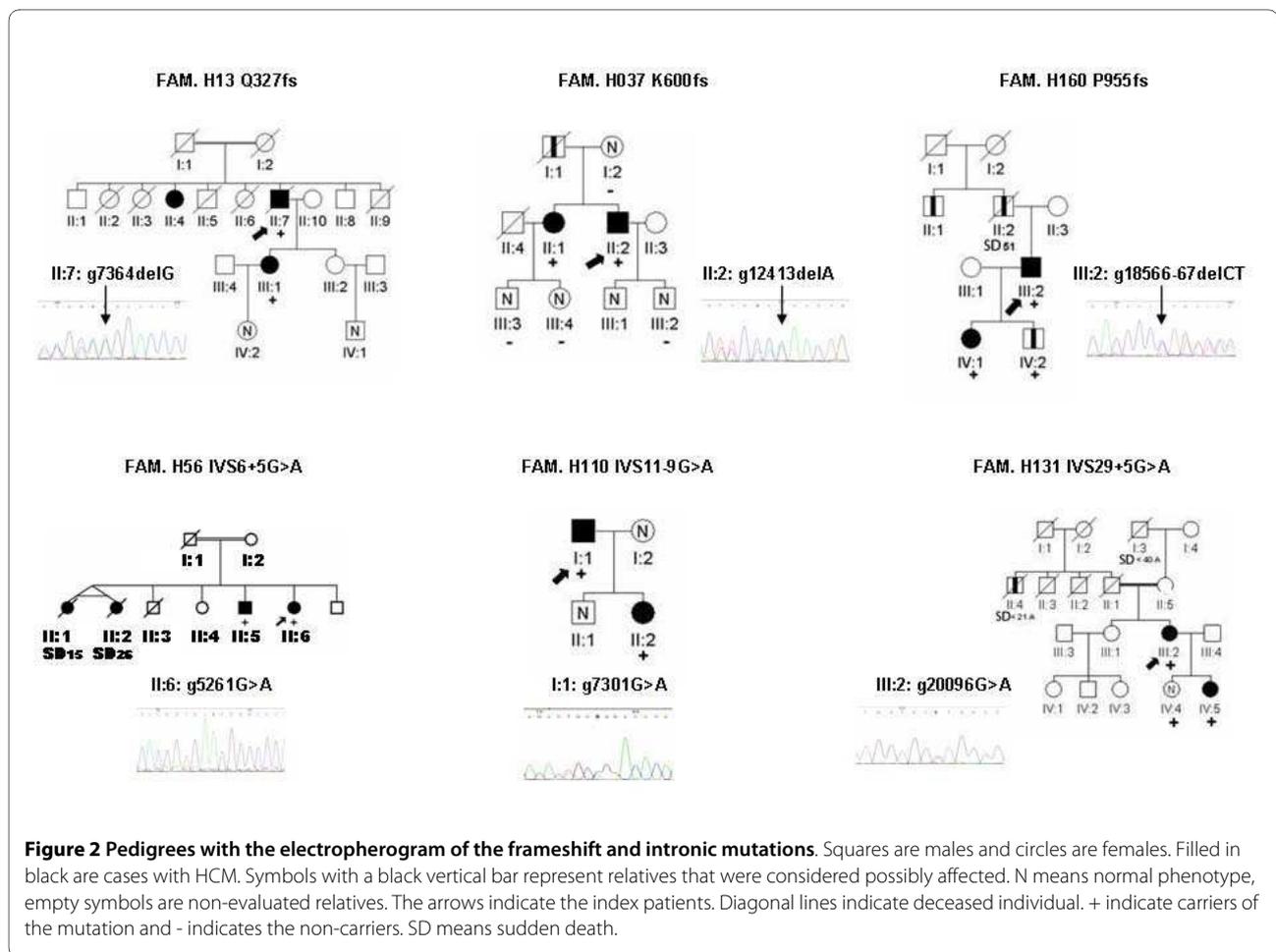
The percentages described in this study, 15% for *MyBPC3* mutations and 0.8% for multiple mutations, were lower than the described in the literature. The high percentage described could be due to polymorphic vari-

ants considered as mutations and the inclusion of related probands. In our study, we considered a variation as a mutation if it was not present in 200 unrelated healthy individuals and our index cases were unrelated.

We have not found significant differences between phenotypes of *MyBPC3* and *MYH7* carriers, as it has been previously described [24].

(i) Not previously described mutations

The pathogenicity of the new mutations must be established based upon criteria of cosegregation, absence in health controls, conservation in the evolution and planned functional alteration.



Pathogenicity is very likely in mutations to provoke the introduction of premature stop codons [26,27], including mutations IVS6+5G>A, IVS11-9G>A, and Q327fs (Table 1 and Figure 2). These truncation mutations could affect protein binding to the thick filament and they could alter the sarcomere's structure and function. In fact, these mutations have been associated to the most severe manifestations of HCM and their association with the disease has been confirmed in animal models [28-30]. However, functional studies of these mutations will be essential to elucidate if they act through a dominant-negative mechanism, if the resulting protein continues to be incorporated into the A-band, or through haploinsufficiency, if the enhanced proteolysis of the truncated protein rather alters the stoichiometry of sarcomeric proteins [31].

Pathogenicity is more difficult to confirm in new mutations of the missense type (D75N and V471E). These mutations did not show up in 200 healthy controls and they affected conserved residue. Moreover, the use of *in silico* tools to predict the pathogenicity of missense mutations showed that D75N and V471E were "likely" to be pathological (at least two online programs predicted a

damaging effect, Table 1). However, the number of identified carriers is scarce and there are several cases of healthy carriers. The presence of healthy carriers is frequent in the mutations in *MyBPC3* due to they can have incomplete penetrance and late development in the hypertrophy [11]. To explain these cases we can speculate that, in the case of V471E, one young healthy women carriers could have had a late onset of the disease expression, and in the case of D75N, as the index cases had been diagnosed at the age of 66, the healthy 68 women could develop HCM in the following years. In favour of their relationship with the disease, we have not identified relatives with HCM who do not carry the mutations. Unless, a relative of D75N index case was probably affected but does not have the mutation; this fact could mean that another factor could be contributing to the development of the HCM.

Therefore, in order to establish the pathogenicity of new mutation, more data about affected and non-affected relatives is needed, and this is not always possible, as in the cases of dead subjects and in those who have declined to participate.

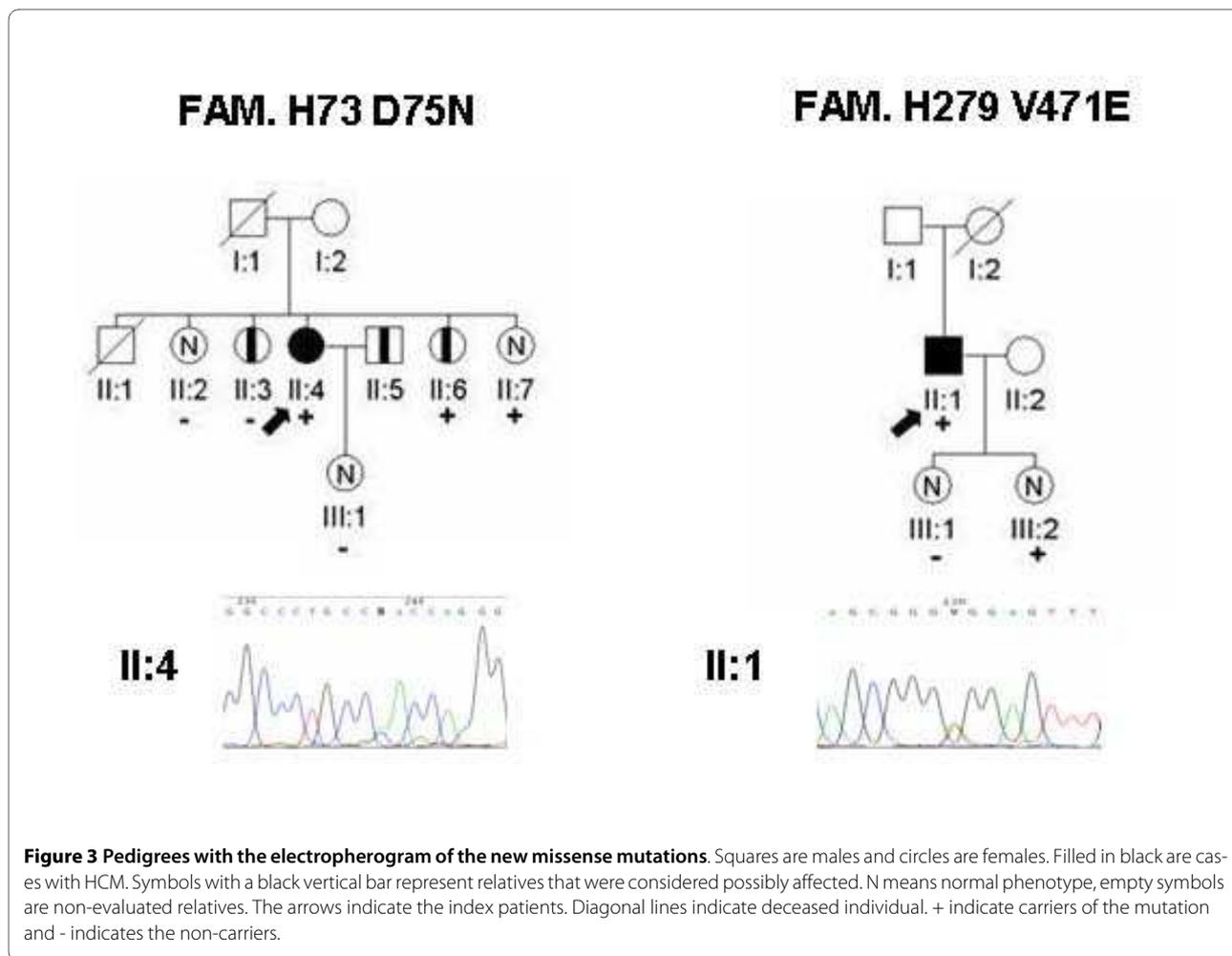


Figure 3 Pedigrees with the electropherogram of the new missense mutations. Squares are males and circles are females. Filled in black are cases with HCM. Symbols with a black vertical bar represent relatives that were considered possibly affected. N means normal phenotype, empty symbols are non-evaluated relatives. The arrows indicate the index patients. Diagonal lines indicate deceased individual. + indicate carriers of the mutation and - indicates the non-carriers.

(ii) Previously described mutations

The identification of a known mutation is clinically more useful, because previous information allows for a better evaluation of the pathogenicity and the genotype-phenotype correlation. For example, the familial study in mutation K504del does not let us confirm its pathogenicity (out of four carriers, one is healthy and another one is questionable, Additional file 1), but the existence of 2 previously described families [18,21] supports the association of the mutation with the disease. In the same way, one of the families with E542Q mutation (H153) has a member who is probably affected and who does not have the mutation. The existence of multiple families in our study (H166, H641) and in other nine families described in the literature [14,18,22-24,32-34] allows us to confirm its association with the disease and it forces us to review its diagnosis (the light-moderate hypertrophy in the electrocardiogram must be confirmed).

Whereas, in mutation R1022P, two possible HCM patients do not have the mutation, and in the case previously described in the literature there are no data about

the familial study [16], so it is not possible to verify its pathogenicity.

On the other hand we provide useful information for the clinicians, like in mutation K600fs (Figure 2), our data confirms the pathogenicity of a previously described mutation in just one case without available clinical data or familial study [18].

(iii) Severe and early forms of HCM and SD in patients with mutations in MyBPC3

It has been suggested that mutations in gene *MyBPC3* are associated with a light clinical and morphological expression and with a late development of hypertrophy [11,35]. However, we identify a relevant number of cases with early severe hypertrophy development, as in the cases of carriers of the following mutations: R502Q, a post-myectomy 42 year old with 20 mm and another 36 mm case at 15; and P955fs, a 28 mm case at 36 and a 16 year old female with 21 mm. Moreover, we also have cases with atrial fibrillation at a young age (K600fs, R1022P, IVS6+5G>A) and several cases of people who underwent surgery when they were young (R502Q and IVS6+5G>A).

Nevertheless, when we gather data about our families and those from previous studies [11,14,16,18,21-24,32-35] (Table 3), we see that in several mutations (R502Q, E542Q, K600fs, P955fs) average age at time of diagnosis is not advanced and thickness is above average in HCM.

HCM has been recognized as the most common cause of SD in the young, especially in competitive athletes [1]. The families associated with SD presented missense mutations (A216T, E542Q) and mutations that lead to aberrant transcripts (P955fs, IVS6+5G>A, IVS29+5G>A).

The association between SD and missense mutations A216T and E542Q is controversial; probably there are other additional factors that can be interacting. The index case of A216T was a woman with HCM and thrombotic problems (she needed two surgical aortic valve replacements and finally went into heart transplantation). On the other hand, the E542Q mutation was present in 3 of our 130 families, but only in one of them has cases of SD.

In our families the most strong association of SD with the mutations is in the mutations that lead to protein truncation (P955fs, IVS6+5G>A, IVS29+5G>A). In fact, the youngest SD (15 and 26 year old) are in the IVS6+5G>A index cases families, and these individuals are likely to be in homozygous as in the index case. This fact could support a gene dosage effect for mutations in

the *MyBPC3* gene that have been previously described where a homozygous mutation is associated with a more severe phenotype than the heterozygous [19].

Conclusions

We have identified mutations in *MyBPC3* in 15% of our families with HCM. Severe hypertrophy and an early expression of the disease are compatible with the presence of mutations in *MyBPC3*.

Genetic studies can play a key role in the comprehensive evaluation of familiar hypertrophic cardiomyopathy and in the development of individualized medicine. This kind of analysis not only allows avoiding clinical follow up of non carriers but it opens new possibilities including: taking preventive clinical decisions in mutation carriers than have not developed the disease yet, the establishment of genotype-phenotype relationship, and establishing a genetic diagnosis routine in patients with familial HCM.

To obtain these purposes, it is important to perform the genetic analysis of index cases and in a high number of their relatives. It is necessary to obtain detailed data about the phenotype of a larger number of carriers, and to complete the genetic study in the severe cases through analysis of other genes in order to establish in which

Table 3: Genotype-phenotype correlation in previously described mutations.

Mutation	R502Q	K504del	E542Q	K600fs	P955fs	R1022P
No. of carriers (HCM/healthy)	23 (17/6)	6 (5/1)	18 (16/0)	3 (3/0)	19 (15/4)	6 (6/0)
No. of non-carriers (HCM/healthy)	10 (0/10)	2 (0/2)	11 (1/10)	3 (0/3)	9 (0/9)	5 (2/3)
No. of controls	350	450	550	200	400	100
Mean age at HCM diagnosis (range)	44 (15-81)	38 (21-59)	45 (16-53)	47 (44-50)	25 (16-36)	42 (23-67)
Mean maximal wall thickness (range)	22 (10-37)	19 (9-34)	23 (17-34)	22 (19-25)	23 (8-35)	18 (14-28)
No. of sudden deaths/No. of families	1/7	0/3	2/12	0/2	4/4	0/3
Other events	-	2 CVA deaths	1 CVA death	2 CVA (1 death)	-	-
References	[11,21,23,35]	[18,21]	[14,18,22-24,32-34]	[18]	[11,18,24]	[16]

CVA: cerebrovascular accident. HCM: hypertrophic cardiomyopathy.

degree the severity of the phenotypes is a feature of the identified mutations or if it depends upon additional factors.

Additional material

Additional file 1 Clinical characteristics of MyBPC3 mutation carriers and affected non-carriers. In this table, it is shown the clinical characteristics of MyBPC3 mutation carriers and affected non-carriers.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LM and MHP conceived and designed the study. MIRG carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. LC, LN and EM participated in the sequence alignment. LM, MO, XF, RBV and EV acquired and interpreted the clinical data. ACB handled funding and supervised the study. Finally, MIRG, LM, LN and MHP drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Inés Alvareño for the technical support.

This study has been funded by a FIS PI070926 project from the Instituto de Salud Carlos III.

Martín Ortiz received funding as a research fellow from Fundación Carolina-BBVA.

Author Details

¹Hospital Universitario de A Coruña-Servicio Galego de Saúde (SERGAS), Instituto de Ciencias de la Salud, As Xubias s/n, A Coruña, 15006, Spain and ²Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de A Coruña (INIBIC), Instituto de Ciencias de la Salud, As Xubias s/n, A Coruña, 15006, Spain

Received: 2 November 2009 Accepted: 30 April 2010

Published: 30 April 2010

References

1. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH, Spirito P, Ten Cate FJ, Wigle ED, Task Force on Clinical Expert Consensus Documents American College of Cardiology; Committee for Practice Guidelines European Society of Cardiology American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy: **A report of American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines.** *Eur Heart J* 2003, **24**:1965-1991.
2. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühn U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuwelt S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A: **Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.** *Eur Heart J* 2008, **29**:270-276.
3. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna WJ, Seidman CE, Seidman JG: **A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation.** *Cell* 1990, **62**:999-1006.
4. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE: **Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy.** *Nat Genet* 1995, **11**:434-437.
5. Seidman JG, Seidman C: **The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms.** *Cell* 2001, **104**:557-567.
6. Arad M, Penas-Lado M, Monserrat L, Maron BJ, Sherrid M, Ho CY, Barr S, Karim A, Olson TM, Kamisago M, Seidman JG, Seidman CE: **Gene Mutations in Apical Hypertrophic Cardiomyopathy.** *Circulation* 2005, **112**:2805-2811.
7. Lind JM, Chiu C, Semsarian C: **Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy.** *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006, **4**:927-934.
8. Winegrad S: **Cardiac myosin binding protein C.** *Circ Res* 1999, **84**:1117-1126.
9. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H: **Cardiac Myosin Binding Protein C: Its role in Physiology and Disease.** *Circ Res* 2004, **94**:1279-1289.
10. Laredo R, Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernández X, Rodríguez I, Cazón L, Alvareño I, Dumont C, Piñón P, Peteiro J, Bouzas B, Castro-Beiras A: **Beta-Myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *Rev Esp Cardiol* 2006, **59**:1008-1018.
11. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna WJ, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE: **Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy.** *N Engl J Med* 1998, **338**:1248-1257.
12. Fokstuen S, Lyle R, Munoz A, Gehrig C, Lerch R, Perrot A, Osterziel KJ, Geier C, Beghetti M, Mach F, Sztajzel J, Sigwart U, Antonarakis SE, Blouin JL: **A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy.** *Hum Mutat* 2008, **29**:879-885.
13. García-Castro M, Coto E, Reguero J, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, Sainz R, Martin M, Moris C: **Espectro mutacional de los genes sarcomericos MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 y TPM1 en pacientes con miocardiopatía hipertrofica.** *Rev Esp Cardiol* 2009, **62**:48-56.
14. Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruard C, Gary F, Labiet S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagege A, Trent RJ, Komajda M, Fiszman M, Schwartz K: **Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy.** *Circ Res* 1997, **80**:427-434.
15. Ehlermann P, Weichenhan D, Zehelein J, Steen H, Pribe R, Zeller R, Lehrke S, Zugck C, Ivandic BT, Katus HA: **Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene.** *BMC Med Genet* 2008, **9**:95.
16. Brito D, Madeira H: **Malignant mutations in hypertrophic cardiomyopathy: fact or fancy?** *Rev Port Cardiol* 2005, **24**:1137-1146.
17. Brion M, Allegue C, Gil R, Torres M, Santori M, Poster S, Madea B, Carracedo A: **Involvement of hypertrophic cardiomyopathy genes in sudden infant death syndrome (SIDS).** *Forensic Sci Int: Genet Suppl* 2009, **2**:495-496.
18. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M: **EUROGENE Heart Failure Project Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy.** *Circulation* 2003, **107**:2227-2232.
19. Ortiz M, Rodríguez-García MI, Hermida-Prieto M, Fernández X, Veira E, Barriales-Villa R, Castro-Beiras A, Monserrat L: **Mutación en homocigosis en el gen MYBPC3 asociada a fenotipos severos y alto riesgo de muerte súbita en una familia con miocardiopatía hipertrofica.** *Rev Esp Cardiol* 2009, **62**:572-575.
20. Andersen PS, Havndrup O, Bundgaard H, Larsen LA, Vuust J, Pedersen AK, Kjeldsen K, Christiansen M: **Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosin-binding protein C (MYBPC3) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency.** *Eur J Hum Genet* 2004, **12**:673-677.
21. Cardim N, Perrot A, Santos S, Morgado P, Padua M, Ferreira S, Reis RP, Monteiro C, Ferreira T, Correia JM, Osterziel KJ: **Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene.** *Rev Port Cardiol* 2005, **24**:1463-1476.
22. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C: **Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling.** *J Med Genet* 2005, **42**:e59.
23. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, Nistri S, Bos JM, Zachara E, Ommen SR, Theis JL, Vaubel RA, Re F, Armentano C, Poggessi C, Torricelli F, Cecchi F: **Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *Mayo Clinic Proceedings* 2008, **83**:630-638.
24. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ: **Myosin binding protein C mutations and compound**

- heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004, **44**:1903-1910.
25. Van Driest SL, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ: **Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy.** *Mayo Clin Proc* 2005, **80**:463-469.
 26. Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K: **Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: From Mutations to Functional Defects.** *Circ Res* 1998, **83**:580-593.
 27. Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B, Frantz E, Fleck E, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V: **Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy.** *J Am Coll Cardiol* 2001, **38**:322-330.
 28. Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J: **A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy.** *J Clin Invest* 1998, **102**:1292-1300.
 29. McConnell BK, Fatkin D, Semsarian C, Jones KA, Georgakopoulos D, Maguire CT, Healey MJ, Mudd JO, Moskowitz IP, Conner DA, Giewat M, Wakimoto H, Berul CI, Schoen FJ, Kass DA, Seidman CE, Seidman JG: **Comparison of two murine models of familial hypertrophic cardiomyopathy.** *Circulation Research* 2001, **88**:383-389.
 30. Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, Powers PA, Moss RL: **Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice.** *Circulation Research* 2002, **90**:594-601.
 31. Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, Frustaci A, Lanfranchi G: **Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **309**:391-398.
 32. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, Isnard R, Hagege A, Langlard JM, Bonne G, Richard P, Hainque B, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M: **Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene.** *Circulation* 1998, **97**:2230-2236.
 33. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bouhour JB, Isnard R, Hagege A, Carrier L, Bonne G, Tesson F, Richard P, Hainque B, Schwartz K, Komajda M: **Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in genotyped children.** *Eur Heart J* 1998, **19**:1377-1382.
 34. Flavigny J, Souchet M, Sebillon P, Berrebi-Bertrand I, Uainque B, Maller A, Bril A, Schwartz K, Carrier L: **COOH-terminal truncated cardiac myosin-binding protein C mutants resulting from familial hypertrophic cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation in fetal rat cardiomyocytes.** *J Mol Biol* 1999, **94**:443-456.
 35. Morita H, Rehm HL, Menesses A, McDonough B, Roberts AE, Kucherlapati R, Towbin JA, Seidman JG, Seidman CE: **Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1899-1908.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/67/prepub>

doi: 10.1186/1471-2350-11-67

Cite this article as: Rodríguez-García *et al.*, Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy *BMC Medical Genetics* 2010, **11**:67

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090069	432	CCG-CTG	Pro-Leu

Comments: According to M12792 Ref. Seq.

Gene symbol: MYBPC3

Disease: Cardiomyopathy, hypertrophic

María Isabel Rodríguez-García, Lorenzo Monserrat, Martín Ortiz, Xusto Fernández, Laura Cazón, Lucía Núñez, Roberto Barriales-Villa, Emilia Maneiro, Elena Veira, Alfonso Castro-Beiras, Manuel Hermida-Prieto

Instituto de Ciencias de la Salud (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Edificio O Fortin. Hospital Marítimo de Oza. As Xubias, s/n, 15006, A Coruña, Spain, E-mail: MA.Isabel.Rodriguez.Garcia@sergas.es

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090070	75	cGAC-AAC	Asp-Asn

Comments: Hypertrophic cardiomyopathy is an autosomal dominant disorder, characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, myocyte hypertrophy and disarray, and interstitial fibrosis. In this study, we analyzed by Single Strand Conformation Polymorphisms and sequencing of the fragments with abnormal motility of the MyBPC3 gene. We found a G-to-A transition at codon 75 in exon 2. This nucleotide variation converts an aspartic acid at codon 75 to an asparagine (D75 N). To identify whether the c223G > A (X84075) is a polymorphism or not, a panel of 249 normal individual was tested and no one was present A base in this site.

Gene symbol: MYBPC3

Disease: Cardiomyopathy, hypertrophic

María Isabel Rodríguez-García, Lorenzo Monserrat, Martín Ortiz, Xusto Fernández, Laura Cazón, Lucía Núñez, Roberto Barriales-Villa, Emilia Maneiro, Elena Veira, Alfonso Castro-Beiras, Manuel Hermida-Prieto

Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Instituto de Ciencias de la Salud (INIBIC), Edificio O Fortin. Hospital Marítimo de Oza. As Xubias., s/n., 15006, A Coruña, Spain, E-mail: MA.Isabel.Rodriguez.Garcia@sergas.es

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090071	471	GTG-GAT	Val-Glu

Comments: Hypertrophic cardiomyopathy is an autosomal dominant disorder, characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, myocyte hypertrophy and disarray, and interstitial fibrosis. In this study, we analyzed by Single Strand Conformation Polymorphisms and sequencing of the fragments with abnormal motility of the MyBPC3 gene. We found a T-to-A transition at nucleotide 471 in exon 16. This nucleotide variation converts a valine at codon 471 to a glutamic acid (V471E). To identify whether the c1412T > A (X84075) is a polymorphism or not, a panel of 163 normal individual was tested and no one was present A base in this site.

Gene symbol: MYBPC3**Disease: Cardiomyopathy, hypertrophic**

María Isabel Rodríguez-García, Lorenzo Monserrat, Martín Ortiz, Xusto Fernández, Laura Cazón, Lucía Núñez, Roberto Barriales-Villa, Emilia Maneiro, Elena Veira, Alfonso Castro-Beiras, Manuel Hermida-Prieto

Instituto de Ciencias de la Salud (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Edificio O Fortin. Hospital Marítimo de Oza. As Xubias., s/n., 15006, A Coruña, Spain, E-mail: MA.Isabel.Rodriguez.Garcia@sergas.es

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090072	1179	cGAG-AAG	Glu-Lys

Comments: Hypertrophic cardiomyopathy is an autosomal dominant disorder, characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, myocyte hypertrophy and disarray, and interstitial fibrosis. In this study, we analyzed by Single Strand Conformation Polymorphisms and sequencing of the fragments with abnormal motility of the MyBPC3 gene. We found a G-to-A transversion at nucleotide 1179 in exon 32. This nucleotide variation converts a glutamic acid at codon 1179 to a lysine (E1179 K). To identify whether the c3535G > A (X84075) is a polymorphism or not, a panel of 203 normal individual was tested and no one was present A base in this site.

Gene symbol: MYBPC3**Disease: Cardiomyopathy, hypertrophic**

María Isabel Rodríguez-García, Lorenzo Monserrat, Martín Ortiz, Xusto Fernández, Laura Cazón, Lucía Núñez, Roberto Barriales-Villa, Emilia Maneiro, Elena Veira, Alfonso Castro-Beiras, Manuel Hermida-Prieto

Instituto de Ciencias de la Salud (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Edificio O Fortin. Hospital Marítimo de Oza. As Xubias., s/n., 15006, A Coruña, Spain, E-mail: MA.Isabel.Rodriguez.Garcia@sergas.es

Input for splicing mutations (single base-pair substitution)

Accession	Nucleotide substitution	Intron designation, number or letter	Donor/acceptor	Relative location
HS090006	G-A	11	Acceptor	9

Comments: Hypertrophic cardiomyopathy is an autosomal dominant disorder, characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, myocyte hypertrophy and disarray, and interstitial fibrosis. In this study, we analyzed by Single Strand Conformation Polymorphisms and sequencing of the fragments with abnormal motility of the MyBPC3 gene. We found a G-to-A transversion in the donor splice site of intron 11 (c.927-9G > A, X84075). 244 normal individual was tested and no one was present A base in this site.

Gene symbol: SCN1A**Disease: Generalized epilepsy with febrile seizures plus****I. Ching Chou, Wei-De Lin, Fuu-Jen Tsai**

Department of Medical Genetics, College of Chinese Medicine, China Medical University, Asia University, China Medical University Hospital, Yuh-Der RD, 2, 404, Taichung, Taiwan (R.O.C.), Tel.: +886-4-22052121-2041, Fax: +886-4-22033295, E-mail: d0704@mail.cmuh.org.tw

Mutación en homocigosis en el gen *MYBPC3* asociada a fenotipos severos y alto riesgo de muerte súbita en una familia con miocardiopatía hipertrófica

Martín F. Ortiz^a, María Isabel Rodríguez-García^a, Manuel Hermida-Prieto^b, Xusto Fernández^c, Elena Veira^a, Roberto Barriales-Villa^c, Alfonso Castro-Beiras^a y Lorenzo Monserrat^a

^aServicio de Cardiología. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. A Coruña. España.

^bInstituto de Ciencias de la Salud. Universidad de A Coruña. A Coruña. España.

^cInstituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Fundación Juan Canalejo. A Coruña. España.

El estudio genético puede resultar una pieza clave en la evaluación integral de la miocardiopatía hipertrófica familiar y en el desarrollo de una medicina individualizada. Hay pocos casos descritos, pero existe un grupo de pacientes con genotipos complejos asociados a manifestación severa de la enfermedad y alto riesgo de muerte súbita. Presentamos una familia caracterizada por evolución precoz a disfunción sistólica y diastólica en algunos de sus integrantes y muerte súbita a edades tempranas en otros. Se detectó una mutación en homocigosis (IVS6+5G>A) en el gen de la proteína C de unión a la miosina, no descrita previamente, que nos permitió explicar el fenotipo de los afectados, estimar el riesgo en otros familiares y ofrecer consejo genético.

Palabras clave: Miocardiopatía. Hipertrófia. Genética. Muerte súbita.

A Homozygous *MYBPC3* Gene Mutation Associated With a Severe Phenotype and a High Risk of Sudden Death in a Family With Hypertrophic Cardiomyopathy

Genetic studies can play a key role in the comprehensive evaluation of familiar hypertrophic cardiomyopathy and in the development of individualized medicine. Although only a few cases have been described, there exists a group of patients with complex genotypes that are associated with severe disease manifestations and a high risk of sudden death. We describe a family in which some members experienced the early development of systolic and diastolic dysfunction while others experienced sudden death at a young age. We identified a novel homozygous mutation (IVS6+5G>A) in the myosin-binding protein-C gene that explained the phenotype of affected individuals and that enabled us to estimate the risk in other family members and to offer genetic counseling.

Key words: Cardiomyopathy. Hypertrophy. Genetics. Sudden death.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es causada fundamentalmente por mutaciones en genes sarcoméricos^{1,2}. El interés de los estudios genéticos es máximo en pacientes con formas severas de la enfermedad. Estos casos pueden deberse a muta-

ciones de alto riesgo, pero también pueden causarlos genotipos complejos con más de una mutación o mutaciones en homocigosis. La información existente sobre pacientes con dobles mutaciones es escasa³⁻⁸. Describimos a una familia en la que el diagnóstico de una mutación en homocigosis nos permitió mejorar la interpretación fenotípica de los afectados y adecuar el consejo genético.

MÉTODOS

El caso índice de esta familia pertenece a una serie de 130 pacientes con MCH controlados en una consulta monográfica de miocardiopatías, a quienes se realizó cribado de mutaciones en los genes *MYH7* y *MYBPC3*. Se extrajo ADN a partir de sangre anticoagulada con EDTA (kit NUCLEÓN, Amersham Biosciences). Se hizo el cribado mediante análisis de polimorfismos por conformación

Este estudio ha sido financiado con una beca de investigación del FIS del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (PI 050377). Xusto Fernández recibe financiación de la Red de Investigación Cardiovascular RECAVA del Instituto de Salud Carlos III de Madrid. Martín F. Ortiz recibe financiación de BBVA-Fundación Carolina.

Correspondencia: Dr. L. Monserrat Iglesias.
Servicio de Cardiología. CHU Juan Canalejo.
As Xubias, 84. 15006 A Coruña. España.
Correo electrónico: lorenzo_monserrat@canalejo.org

Recibido el 13 de mayo de 2008.

Aceptado para su publicación el 2 de julio de 2008.

de la cadena sencilla de cada fragmento, y se secuenciaron aquellos con movilidad anormal. Se descartaron mutaciones adicionales utilizando una plataforma de genotipificación que incluye 690 mutaciones descritas en 15 genes (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TPMI*, *ACTC*, *MYL2*, *MYL3*, *TTN*, *MYH6*, *TCAP*, *MYO6*, *PRKAG2* y *MYLK2*). Todos los participantes dieron su consentimiento informado para realizar análisis genéticos.

RESULTADOS

La figura 1 muestra el árbol genealógico. Dos hermanas gemelas univitelinas habían fallecido súbitamente con 15 y 26 años sin haber sido revisadas. Un hermano falleció por accidente a los 36 años. Se pudo estudiar clínica y genéticamente a 2 hermanos afectados.

El caso índice es una mujer que consultó por dolor precordial atípico a los 34 años. El examen físico era normal y tenía alteraciones difusas de la repolarización con ondas T negativas laterales poco profundas en el ECG. El ecocardiograma constató hipertrofia en septo, pared anterior y lateral a nivel basal, medio y apical, con grosor máximo de 24 mm en septo anterior basal, sin obstrucción subaórtica. Presentaba disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI, 50%) sin dilatación (48 mm), disfunción diastólica severa y agrandamiento auricular izquierdo (58 mm) (fig. 2). Alcanzó 9 MET en la ergometría, con caída de la presión arterial sistólica de 30 mmHg (de 120/70 a 90/60 mmHg) durante el ejercicio. Presentó rachas de ta-

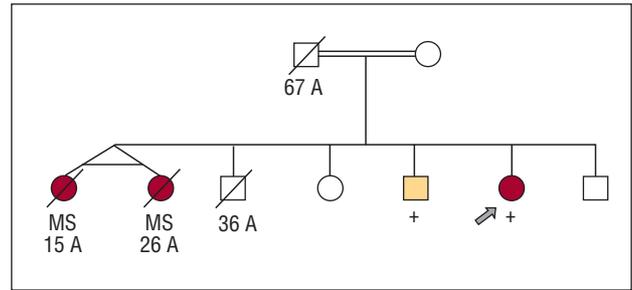


Fig. 1. Árbol familiar. Cuadrados: varones; círculos: mujeres; símbolos sin relleno: individuos sin cardiopatía conocida; símbolos con relleno: afectados con MCH o muerte súbita. El símbolo + indica portadores homocigotos de la mutación; símbolos tachados indican individuos fallecidos, con la edad al deceso. El trazo doble indica consanguinidad. La flecha señala el caso índice.

quicardia ventricular no sostenidas de hasta 27 latidos en el Holter. Se le implantó un desfibrilador por la presencia de tres factores de riesgo: antecedentes familiares de muerte súbita, taquicardia ventricular no sostenida y caída de la presión arterial en esfuerzo. En un período de 6 meses tras el implante tuvo cuatro episodios de taquicardia ventricular no sostenida prolongados, que fueron tratados por el dispositivo. Tras el aumento de los bloqueadores beta y la reprogramación del desfibrilador, en 4 años de seguimiento no hubo otras terapias. El ecocardiograma con 39 años muestra disminución ligera del grosor (máximo 22 mm) y dilatación ventricular izquierda (55 mm) con similar fracción de eyección.

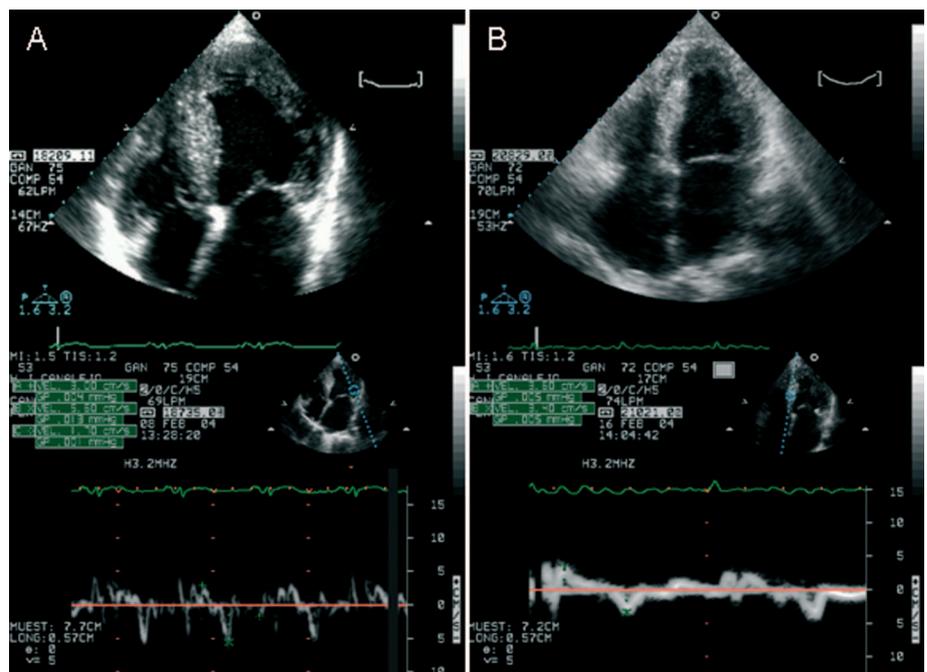


Fig. 2. Ecocardiograma Doppler del caso índice (A) y su hermano afectado (B). Arriba: imágenes apicales de cuatro cámaras con hipertrofia ventricular izquierda y dilatación de ambas aurículas. Abajo: imágenes del Doppler tisular con velocidades bajas.

Su hermano fue diagnosticado a los 28 años en otra institución en estudio preoperatorio. Acudió por primera vez a nuestra consulta a los 34 años refiriendo disnea en clase funcional II de la NYHA, con fibrilación auricular y bloqueo incompleto de rama derecha en el ECG. Presentaba hipertrofia concéntrica sin obstrucción subaórtica (grosor máximo, 26 mm), disfunciones sistólica (FEVI, 36%) y diastólica severas, con dilatación auricular izquierda (59 mm) (fig. 2). Había recibido amiodarona por taquicardia ventricular no sostenida, que se suspendió por hipertiroidismo. Se recomendó implante de desfibrilador por factores de riesgo (antes del diagnóstico genético).

Había antecedentes de consanguinidad entre sus padres (fig. 1). Su madre fue revisada en otro centro y se la consideró fenotípicamente normal (no ha acudido a revisión en nuestro centro). Su padre falleció en un accidente a los 67 años y tiene 6 hermanos varones, todos sin cardiopatía conocida.

En el caso índice y en su hermano afectado se detectó en homocigosis la mutación IVS6+5G>A (g5261G>A) en el gen *MYBPC3*, no descrita previamente, que produciría truncamiento de la proteína C a nivel del motivo C2.

DISCUSIÓN

Aproximadamente un 5% de los casos con MCH familiar presentan estados genéticos complejos con más de una mutación causal: homocigotos (ambos alelos del gen mutados), heterocigotos dobles (más de una mutación en genes diferentes) o heterocigotos compuestos (más de una mutación en el mismo gen)³⁻⁸. En nuestra serie la prevalencia fue del 1,5% (el caso índice descrito previamente y un heterocigoto compuesto en *MYH7*⁹). Para nuestro conocimiento existen sólo cuatro mutaciones en homocigosis y 17 portadores descritos en el gen *MYBPC3*^{3,10-13}. Todos tienen fenotipos más severos y peor pronóstico con respecto a heterocigotos simples. Nuestro trabajo es el primero en describir dos hermanos homocigotos en los que se reproduce un fenotipo severo.

Esta familia ejemplifica el efecto de la dosis del gen en la severidad de expresión de la enfermedad. Dos portadores homocigotos presentan manifestaciones graves de MCH: síntomas a edades tempranas, marcada hipertrofia, disfunción sistólica y diastólica. La muerte súbita precoz en sus hermanas indica que también podrían haber sido portadoras homocigotas. El antecedente de consanguinidad es importante para sospechar patrones genéticos complejos como éste. No disponemos del genotipo de los padres, pero deben ser considerados portadores obligados heterocigotos de la mutación, probablemente heredada de un antepasado común. Ambos

llegaron a la edad adulta sin manifestaciones de cardiopatía, lo que indica que un único alelo mutado podría no ser causa suficiente para el desarrollo de la enfermedad o generar un fenotipo ligero de expresión tardía.

La mutación IVS6+5G>A afectaría al corte y empalme del ADN, generando transcritos aberrantes. Estudios funcionales en mutaciones con efecto similar demostraron que el péptido truncado producido por el alelo mutado es degradado antes de incorporarse al sarcómero (haploinsuficiencia). La pérdida de este mecanismo explicaría la expresión severa de mutaciones en homocigosis¹⁴. La respuesta y la viabilidad celular podría variar en función de la cantidad de péptido mutado presente. Así, mutaciones en heterocigosis producirían hipertrofia miocárdica por dominancia negativa sobre la función sarcomérica. En tanto que su presencia en homocigosis produciría cantidades de péptidos mutados que superarían un umbral crítico como para producir muerte celular y pérdida de miocitos, con evolución a disfunción sistólica y dilatación ventricular¹⁵. Este mecanismo podría estar asociado con la dilatación ventricular y el adelgazamiento parietal observado en el seguimiento de nuestro caso índice y con la disfunción sistólica severa de su hermano.

En conclusión, esta familia ilustra la utilidad del diagnóstico genético en la evaluación pronóstica de la MCH y remarca la importancia de una valoración clínica integral en pacientes con esta enfermedad. Los antecedentes familiares y la severidad del fenotipo indicaban la posible existencia de una mutación maligna y alto riesgo para los hijos de los portadores. El hallazgo de una mutación en homocigosis en los afectados cambia radicalmente nuestra visión del pronóstico de otros familiares. Estos aspectos cobran importancia al momento de ofrecer consejo genético. Es de esperar que los descendientes hereden sólo una copia de la mutación y no desarrollen un fenotipo severo como sus padres. Como limitación, no ha sido posible evaluar directamente a toda la familia y no hemos podido caracterizar adecuadamente el fenotipo de los heterocigotos.

BIBLIOGRAFÍA

1. McKenna WJ, Monserrat L. Identificación y tratamiento de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica y riesgo de muerte súbita. *Rev Esp Cardiol*. 2000;53:123-30.
2. Towbin JA. Molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2:134-40.
3. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107:2227-32.
4. Nishi H, Kimura A, Harada H, Adachi K, Koga Y, Sasazuki T, et al. Possible gene dose effect of a mutant cardiac beta-

- myosin heavy chain gene on the clinical expression of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;200:549-56.
5. Ho CY, Lever HM, DeSanctis R, Farver CF, Seidman JG, Seidman CE. Homozygous mutation in cardiac troponin T: implications for hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2000;102:1950-5.
 6. Richard P, Charron P, Leclercq C, Ledeuil C, Carrier L, Dubourg O, et al. Homozygotes for a R869G mutation in the beta-myosin heavy chain gene have a severe form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1575-83.
 7. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counseling. *J Med Genet.* 2005;42:e59.
 8. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1903-10.
 9. Laredo R, Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernández X, Rodríguez I, Cazón L, et al. Mutaciones en el gen de la cadena pesada de la betamiosina en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev Esp Cardiol.* 2006;59:1008-18.
 10. Xin B, Puffenberger E, Tumbush J, Bockoven JR, Wang H. Homozygosity for a novel splice site mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene causes severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet A.* 2007;143:2662-7.
 11. Zahka K, Kalidas K, Simpson MA, Cross H, Keller B, Galambos C, et al. Homozygous mutation of MYBPC3 associated with severe infantile hypertrophic cardiomyopathy at high frequency amongst the Amish. *Heart.* 2008; doi:10.1136/hrt.2007.127241.
 12. García-Castro M, Reguero JR, Álvarez V, Batalla A, Soto MI, Albaladejo V, et al. Hypertrophic cardiomyopathy linked to homozygosity for a new mutation in the myosin-binding protein C gene (A627V) suggests a dosage effect. *Int J Cardiol.* 2005;102:501-7.
 13. Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:391-8.
 14. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res.* 2004;94:1279-89.
 15. McConnell BK, Jones KA, Fatkin D, Arroyo LH, Lee RT, Aristizábal O, et al. Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice. *J Clin Invest.* 1999;104:1235-44.