

Miocardiopatía hipertrófica familiar y muerte de súbito: nuevas herramientas pal estudiu xenómico

Por Xosé A. Suárez Puente

Departamentu de Bioquímica y Biología Molecular
Instituto Universitariu d'Oncoloxía (IUOPA)
Universidá d'Uviéu

nature.com | Publications A-Z index | Browse by subject | Search | Go | Advanced search

THE REPRODUCIBILITY CRISIS
New content added monthly
Access the Special online

nature
SPECIAL

My account
Submit manuscript
Register
Subscribe

Login | Cart

nature COMMUNICATIONS

Home | About the journal | Authors and referees | Browse archive | Search

ARCHIVE

Browse by: Date | Article type | Subject terms


OCTOBER 2014


+ 2015 | 2014 | + 2013 | + 2012 | + 2011 | + 2010

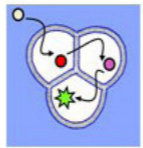
Jan | Feb | Mar | Apr | May | Jun | Jul | Aug | Sep | Oct | Nov | Dec

October 2014: 31 | 30 | 29 | 28 | 27 | 24 | 22 | 21 | 20 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 10 | 09 | 08 | 07 | 06 | 03 | 01

31 October 2014

 **ARTICLE**
On the absence of intrahelical DNA dynamics on the μ s to ms timescale **OPEN**
Rodrigo Galindo-Murillo, Daniel R. Roe, Thomas E. Cheatham III
Biological Sciences | Biochemistry | Bioinformatics
Abstract | Full Text | PDF (0 kB)

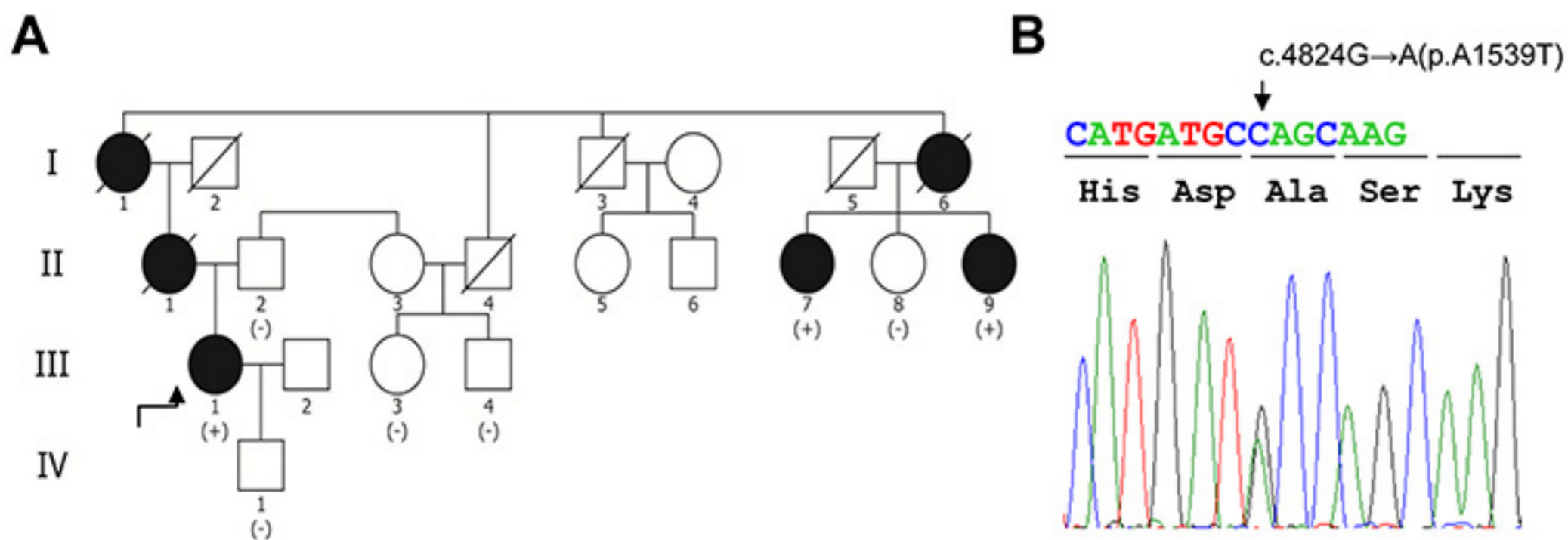
 **ARTICLE**
Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy
Rafael Valdés-Mas, Ana Gutiérrez-Fernández, Juan Gómez, Eliecer Coto, Aurora Astudillo, Diana A. Puente, Julián R. Reguero, Victoria Álvarez, César Morís, Diego León, María Martín, Xose S Puente, Carlos López-Otin
Biological Sciences | Genetics
Abstract | Full Text | PDF (0 kB) | Supplementary Information

 **ARTICLE**
Vesicle-based artificial cells as chemical microreactors with spatially segregated reaction pathways **OPEN**
Yuval Elani, Robert V. Law, Oscar Ces
Chemical Sciences | Bioengineering | Biophysics | Chemical biology
Abstract | Full Text | PDF (0 kB)

Knock Out Any Gene!
CRISPR / Cas9
Genome Editing Kits
click now for more info!
ORIGENE

ARRIBA

Índiz del Nature Communications onde, n'ochobre de 2014, díose l'anuncia de les rellaciones ente una mutación nun xen de la proteína muscular filamina C y la miocardiopatía hipertrófica familiar, como s'esplica nesti artículu.



IZQUIERDA
Figura 1. Árbol genealógico de la familia estudiada.

ENTAMU

Las enfermedades cardiovasculares representan la causa número uno de muerte en sociedades occidentales. Con más de 17 millones de muertes al año, los infartos de miocardio o las enfermedades coronarias constituyen, entre otros males como el cáncer. Y es por esto que, desde hace más de medio siglo, muchas de las estrategias nacionales de salud se centran en disminuir el número de muertes por enfermedades del corazón. El estudio de las características de los pacientes con estas enfermedades puede ayudar a identificar parámetros clínicos, como

La miocardiopatía hipertrófica es una enfermedad genética, relativamente común, que afecta a 1 de cada 500 personas. En el año 1989 se identificó el primer xenoma en el que las mutaciones causaban esta enfermedad

presión sanguínea alta o niveles de colesterol o triglicéridos elevados, asociados a estas enfermedades. Por suerte, muchos de estos parámetros clínicos pueden, al mismo tiempo, vencerse a través de la alimentación o el ejercicio. Esta interrelación entre las causas de una enfermedad y los hábitos de comportamiento ofrece una alternativa terapéutica que no es muy común en el resto de patologías. Cambios en la dieta y la actividad pueden prevenir claramente el desarrollo de las enfermedades

cardiovasculares, ofreciéndose como una de las principales estrategias para disminuir el número de muertes causadas por estas enfermedades.

Sin embargo, los factores externos no son la principal causa de riesgo para una proporción de pacientes sino la presencia de mutaciones genéticas. Algunas de estas mutaciones son capaces de aumentar el riesgo de desarrollar estas patologías a los familiares que portan dichas mutaciones. En estos casos, la conciencia de qué

xen ta mutáu nuna familia ye útil pa facer una xera de conseyu xenéticu y un siguimientu del individu u inda enantes de que tenga síntomas de la enfermedá, asina como pa facer una xera preventiva.

Hai delles enfermedaes cardiovasculares que puen tener un orixe xenéticu, incluyendo la hipercolesterolemia familiar, la hipolipoproteíemia familiar, alteraciones de la presión sanguínea por causes xenéticas, síndrome de Marfan, defectos nos septos o nes válvules, o la miocardiopatía hipertrófica (Fellin *et al.* 2015; Kathiresan & Srivastava 2012). Esta cabera ye una enfermedá xenética relativamente común –qu’afeuta a 1 de cada 500 persones– y carauterízase por un enanchamientu de la parede muscular del corazón, el miocardi u. L’estudiu de families con esta patoloxía permitió identificar, nel añu 1989, el primer xen nel que les sos mutaciones causaben esta enfermedá (Seidman & Seidman 2012). Viose asina que mutaciones nel xen que codifica la cadena pesada de la beta-miosina cardiaca (*MYH7*) asociáben se a esta enfermedá.

Dende hai 25 años que se descubriere’l primer xen causante d’esta enfermedá (Geisterfer-Lowrance *et al.* 1990), l’estudiu de más families con miocardiopatía hipertrófica permitió la identificación de mutaciones en nuevos xenes, inclu-

yendo *TNNT2*, *TPM1*, *TNNI3* o *MYL2*, ente otros. La mayor parte d’estos xenes codifiquen proteínes que formen el sarcómeru muscular, poro, mutaciones nestos xenes dan nun funcionamientu anormal d’esta estructura, contribuyendo al desendolcu d’esta patoloxía. Sicasí, a pesar del avance que supunxo la identificación de mutaciones nestos xenes pal siguimientu d’esta enfermedá, les mutaciones nestos namái espliquen un 60% de los casos de miocardiopatía hipertrófica familiar, lo que suxer qu’un 40% de les families con esta enfermedá ye pola mor de mutaciones n’otros xenes qu’inda nun se conocen.

Por esta razón, nel trabayu espublizáu por Valdés-Mas *et al.* (2014), fíxose por estudiar families con miocardiopatía hipertrófica y que nun tuvieren mutaciones nos xenes conocíos hasta’l momentu.

Suxetos d’estudiu

El casu índiz yera una paciente de 53 años (*CAR2* _ III-I) a la que diagnosticaren, a los 20 años, miocardiopatía hipertrófica consistente colos criterios establecíos, incluyendo electrocardiografía qu’amosaba una hipertrofia del ventrículu esquierdu y ecocardiografía qu’amosaba un septu hipertróficu de 27 mm. El casu yera consistente con un casu de miocardiopatía

hipertrófica familiar pola presencia de más miembros de la familia con esta patoloxía. La figura 1 amuesa l’árbol xenéticu de la familia. La ma finare de muerte de súpitu a los 34 años y la güela y tía güela tamién finaren por causes cardiaques a los 62 y 55 años, respetivamente. Dos parientes más (*CAR2* _ II-7 Y *CAR2* _ II-9) (Fig. 1) tamién se diagnosticaren de miocardiopatía hipertrófica a los 45 y 82 años, respetivamente. L’análisis de los xenes conocíos de miocardiopatía hipertrófica familiar, incluyendo *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC1*, *TNNC1*, *MYL2* Y *MYL3*, nun foren a detectar mutaciones nesti paciente, suxiriendo que la herencia d’esta enfermedá na familia yera por cuenta de mutaciones n’otru xen.

Identificada una variante nel xen FLNC que provoca’l cambéu p.A1539T, l’ADN de cuatro de los miembros con miocardiopatía hipertrófica de los nueve vivos de la familia estudiada tenía esa variante p.A1539T

Secuenciación del exoma d’un paciente con miocardiopatía hipertrófica familiar

Col envís d’atopar posibles mutaciones responsables d’esta enfermedá familiar, y aprovechando los recientes avances en teunoxíes de secuenciación masiva d’ADN, procedióse a secuenciar l’exoma del casu índiz. Pa ello, partióse de tres microgramos d’ADN, que se frayaron, y les rexones codificantes atrapáronse per aciu del emplegu de sondes d’ARN biotinilao correspondientes a más de 200.000 exones del xenoma humanu. Les llibreríes resultantes secuenciáronse usando la teunoloxía Illumina HiSeq2000, xenerándose más de 80 millones de secuencies, que s’analizaron usando la ferramenta d’análisis de xenomes *Sidróu* (Puente *et al.* 2011). El re-

sultau aportó la existencia de casi 20.000 variantes con respecto al xenoma de referencia y ninguna d'elles afeutaba a dalgún de los xenes conocíos que causen miocardiopatía hipertrófica. Col enfotu d'identificar nuevas mutaciones que pudieren causar esta enfermedá, peñeráronse toles variantes, desanicando aquellos variantes comunes que taben presentes en más del 1% de la población acordies cola base de datos dbSNP135 (Sherry *et al.* 2001). D'esta miente, atopáronse 128 variantes xenéticas que nun yeren comunes na población, y qu'afeutaben a la función de les proteínes codificaes polos xenes afeutaos pola mor de la producción de cambeos d'aminoácidu, codones de parada prematuros, cambeos nos sitios d'empalme o cambeos na pauta de llectura. Col envís de peñerar inda más los datos, emplegáronse bases de datos d'espresión xénica pa esbillar aquellos

xenes con una espresión en músculu cardiacu. D'esta miente, identificóse una única variante, nel xen *FLNC*, que codifica la filamina c específica del músculu y que participa na diferenciación de los miocitos, provocando'l cambéu p.A1539T.

Como primer pasu pa establecer si la variante identificada podría representar una nueva mutación causante de miocardiopatía familiar, procedióse a estudiar si dicha variante segregaba cola enfermedá. Pa ello, fíxose l'análisis d'esta variante en tolos miembros disponibles de la familia al traviés de l'amplificación d'esa

DERECHA
Figura 2. Estratexa de secuenciación por lletes.

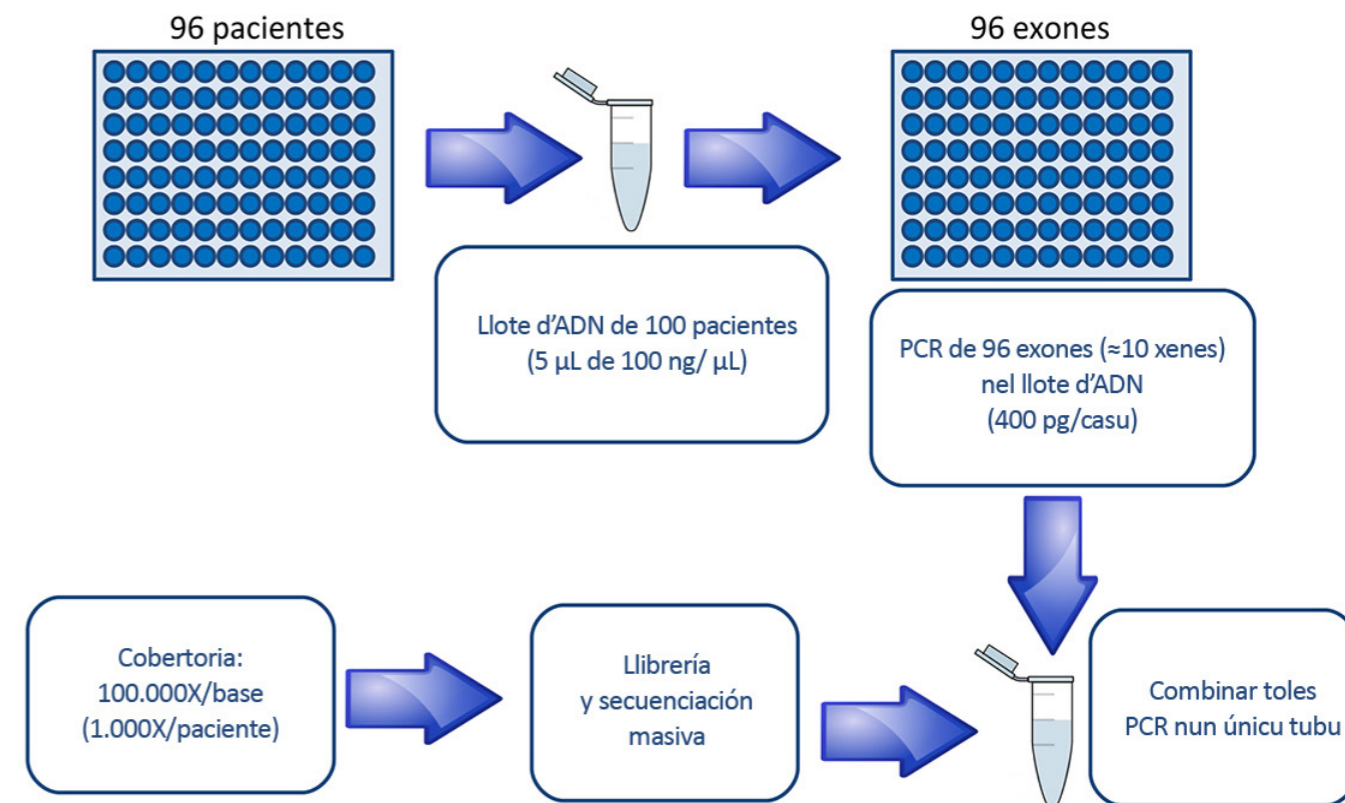


Tabla 1. Mutaciones identificaes na *FLNC* en families con miocardiopatía hereditaria

Familia	Variante (hg19)	Cambéu d'aminoácidu	PredicciónSI FT	Predicción PolyPhen
176	chr7:128,471,013 G>T	p.E108X	Deletérea	Probablemente dañible
84	chr7:128,475,395 T>C	p.V123A	Deletérea	Probablemente dañible
195	chr7:128,477,710 C>A	p.N290K	Deletérea	Probablemente dañible
2	chr7:128,488,649 G>A	p.A1539T	Deletérea	Probablemente dañible
304	chr7:128,488,649 G>A	p.A1539T	Deletérea	Probablemente dañible
242	chr7:128,493,858 G>A	p.G2151S	Deletérea	Probablemente dañible
125	chr7:128,494,682 C>A	p.H2315N	Deletérea	Benigna
240	chr7:128,496,609 C>T	p.A2430V	Neutral	Probablemente dañible

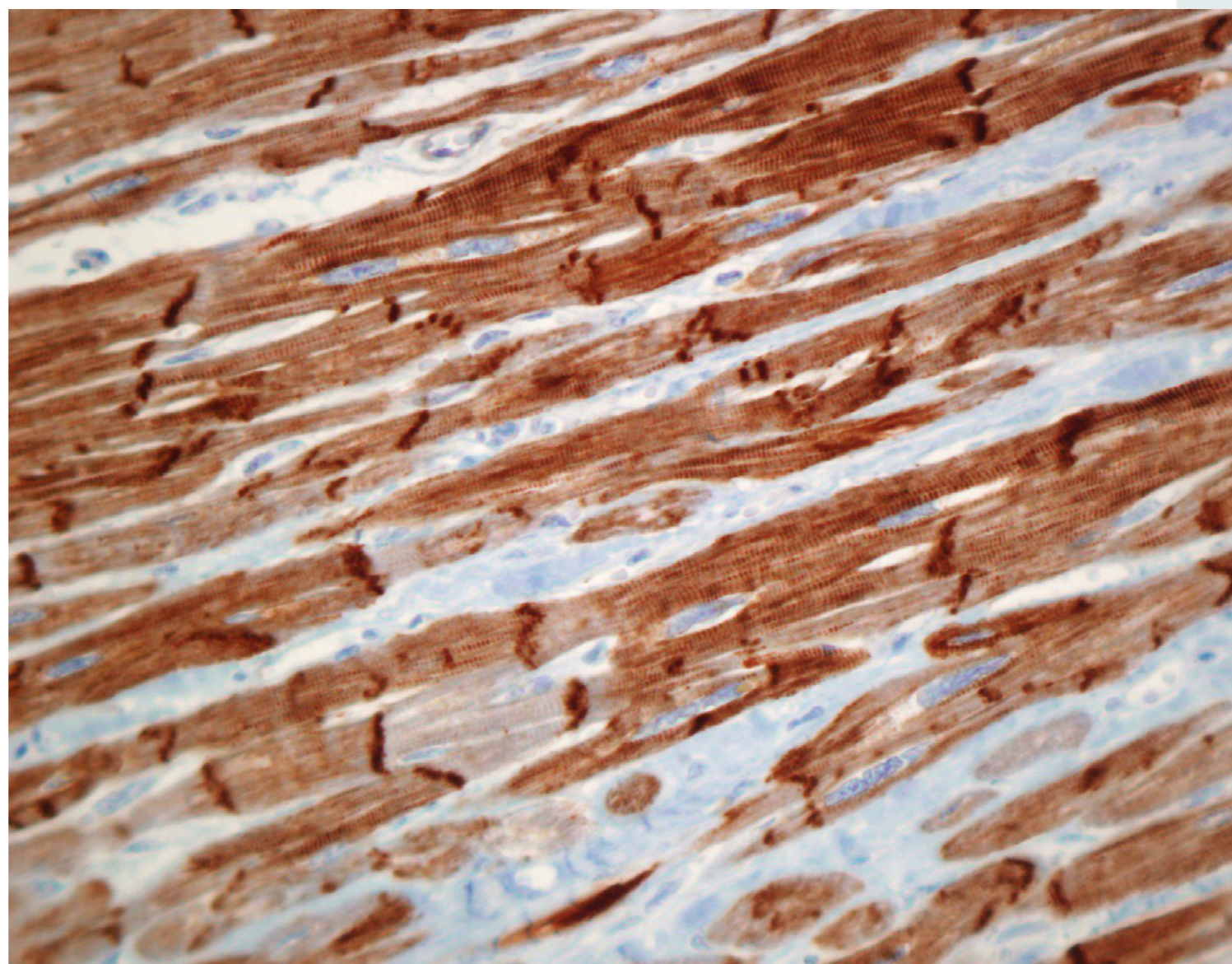
rexón pola reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación Sanger darréu. L'análisis del ADN de nueve miembros vivos d'esta familia (Fig. 1) amosó que los cuatro miembros de la familia con miocardiopatía hipertrófica teníaen la variante p.A1539T, mientras que cinco miembros non afeutaos nun la teníaen, confirmando que la variante segregaba cola enfermedá. Entá, tres individuos más de la familia (I-1, II-1 y I-6), que yeren portadores obligaos de la variante p.A1539T, pero pa los que nun hubiere ADN afayadizo pal análisis, finaren pola mor de causes cardíacas y consideráronse afeutaos. L'inxerimentu d'estos portadores obligaos nel análisis amosó qu'había un lligamentu ente la variante de la *FLNC* y la miocardiopatía hipertrófica nesta familia (LOD=2.33).

Variante en *FLNC* en families con miocardiopatía hipertrófica

Col oxetivu d'explorar si otres variantes nel xen que codifica la filamina c podríen tar presentes n'otres families con esta enfermedá, secuenciáronse los 48 exones codificantes del xen *FLNC* nuna esbilla de 92 pacientes con miocardiopatía hipertrófica (19% con segregación familiar, y 81% aparentemente esporádicos), y que nun presentaben mutaciones nos xenes sarcoméricos conocíos. La secuenciación d'esti grupu de pacientes fíxose per mediu d'una estratexa d'amplificación por PCR en lletes, y secuenciación masiva (Fig. 2) (Puente *et al.* 2011). Esti estudiu asoleyó seis variantes ensin sentíu nuevas y una variante truncante (Tabla 1). En conxuntu, identificáronse ocho variantes úniques en nueve

pacientes de miocardiopatía hipertrófica. La secuenciación de familiares de estos pacientes permitió identificar 18 individuos más con variantes en *FLNC*. Ninguna de esas variantes estaba presente en 440 individuos de la población española, individuos del proyecto 1000genomes (Abecasis *et al.* 2010), o en el proyecto de secuenciación de exomas (ESP), con la excepción de la variante p.A2430V, presente en dos alelos de más de 12.000 análisis. Con el fin de determinar si el número de pacientes con mutaciones en *FLNC* identificados en nuestra serie era diferente de lo esperado en la población general, se hizo una comparación de estos resultados con los datos de la población americana de ascendencia europea, dentro del proyecto ESP. De este modo, encontramos que 98 individuos de un total de 4.200 del proyecto ESP tenían variantes en el gen *FLNC* predichos como dañinos por los programas SIFT y PolyPhen (Kumar *et al.* 2009; Adzhubei *et al.* 2010), incluyendo algunos cambios de pauta y codones prematuros en el extremo C-terminal y similares a los descritos en la miopatía miofibrilar (Vorgerd, M. *et al.* 2005). Por el contrario, en nuestro análisis de pacientes con miocardiopatía hipertrófica, encontramos 7 pacientes de un total de 92 con variantes en *FLNC* predichas como dañinas por ambos algoritmos (Prueba Exacta de Fisher $P=0.0068$, $OR=3.44$, 95% CI: 1.31–7.68), lo que indica que es improbable encontrar esta distribución de mutaciones al azar.

Además, se pudo observar que había una fuerte correlación entre la presencia de una variante en *FLNC* y el estado clínico de los familiares analizados (LOD combinado = 4.1). Así, de los 16 individuos mayores de 40 años y que tenían una variante en *FLNC*, 14 de ellos tenían síntomas de miocardiopatía hipertrófica, lo que indica una penetrancia del 87%. La presencia de mutaciones en *FLNC* se asoció con una



ARRIBA
Figura 3. Inmunohistoquímica de filamina c en tejido cardíaco.

Nó otro estudio, 5 de 9 familias con mutaciones en el gen *FLNC* (un 56%) presentaban casos de muerte de súbito, en comparación con nada 23 de 84 casos (27%) sin variantes en *FLNC*. La presencia de mutaciones en *FLNC* se asoció con una mayor frecuencia de historia familiar con miocardiopatía hipertrófica (87%)

mayor frecuencia de historia familiar de miocardiopatía hipertrófica (55 frente a 17.8%, $P<0.01$). Es interesante destacar que cinco de las nueve familias con mutaciones en *FLNC* (56%) presentaban casos de muerte de súbito, en comparación con 23 de 84 casos (27%) sin variantes en *FLNC* ($P<0.05$).

Les variantes en filamina c afectan a la estructura del músculo cardíaco

La filamina c es una proteína que forma parte del sarcómero y es importante en la diferenciación muscular. Por lo tanto, es interesante que las mutaciones en el gen que lo codifica puedan provocar problemas con la estructura muscular. De este modo, desde el año 2005 se conoce que las mutaciones en *FLNC* se asocian con la miopatía miofibrilar (MIM 609524) (Vorgerd, M. *et al.* 2005). Así, ninguno de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica de este estudio presentaba síntomas de miopatía miofibrilar, incluyendo nueve pacientes de más de 44 años, que es la edad media a la que aparecen los síntomas de la mutación más frecuente en *FLNC* (p.W2710X). Igualmente, el estudio de biopsias musculares de dos de estos pacientes con mutaciones en *FLNC* (p.A1539T y p.H2315N) mostró una estructura normal del sarcómero en el músculo esquelético, lo que contrasta con los estudios histológicos del músculo cardíaco. Asimismo, se analizó el corazón de dos pacientes con mutaciones en *FLNC* que fueron trasplantados. Este análisis confirmó la presencia de anomalías en el sarcómero como el desordenamiento miofibrilar, agregados sarcoméricos y fibrosis, que no se observaron en los corazones control de pacientes con miocardiopatía hipertrófica sin mutaciones en *FLNC* o de un donante sano (Fig. 3).

Análisis funcional de las mutaciones en *FLNC* La filamina C es una proteína grande, constituida por más de 2.725 aminoácidos. Una de las características de estas mutaciones identificadas en filamina C es que afectan a restos que se conservan en la evolución perfectamente, desde peces hasta humanos (Fig. 4), sugiriendo que se traten de restos importantes para la función de esta proteína. Por otra parte, la distribución de las mutaciones nunca es al azar, sino que la mayor parte de las mutaciones agrúpanse en el cabe

terminal (dominio de unión a actina y primera repetición) y en el cabe c-terminal (cuatro cabe

repeticiones). Todos estos datos hacen pensar que estas variantes atopadas en *FLNC* en pacientes con miocardiopatía hipertrófica podrían mermar la función de esta proteína sarcomérica. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se construyeron vectores de expresión con *CADN* de la filamina C y, por medio de mutagénesis dirigida, se generaron clones con las mutaciones identificadas en los pacientes de miocardiopatía hipertrófica.

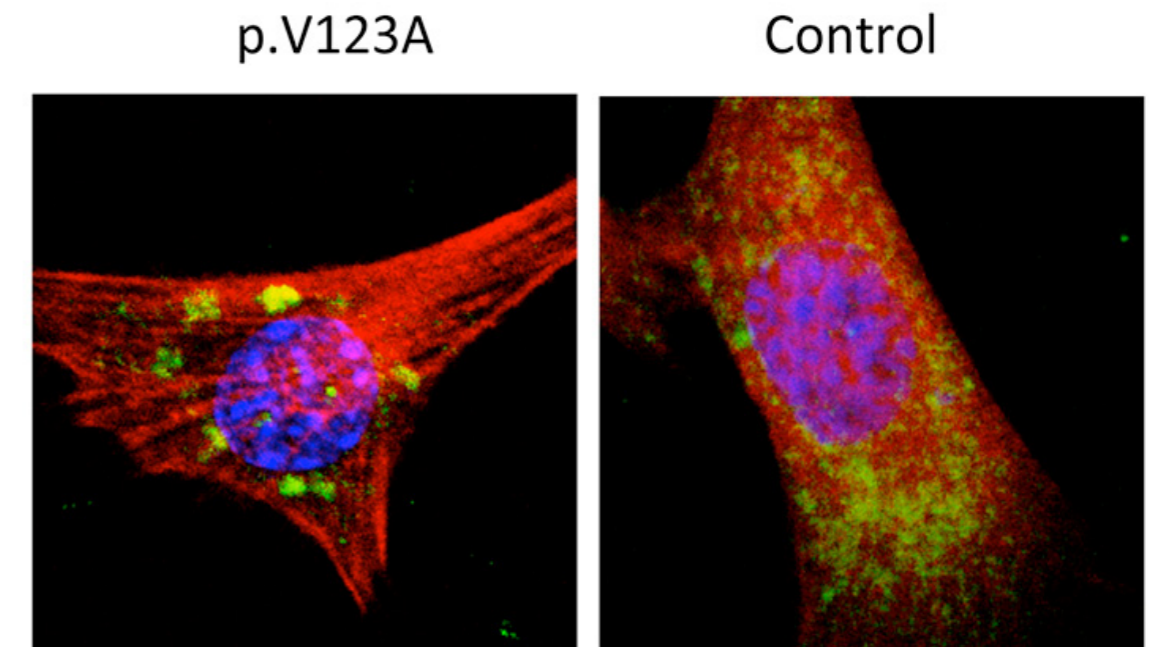
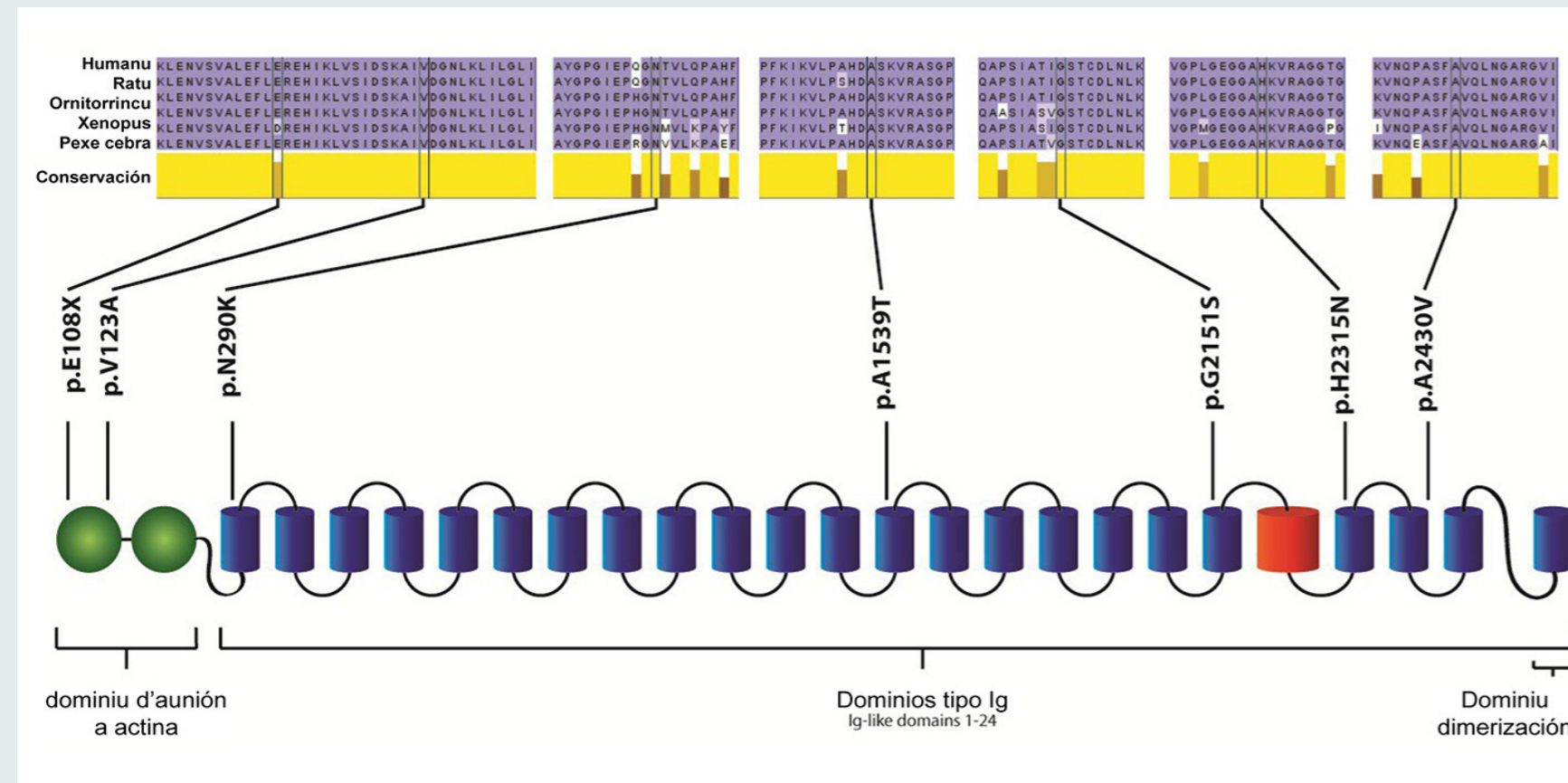
La introducción de estas construcciones en mioblastos cardíacos de aguarón (H9c2) por medio de nucleofección, puede demostrar, tanto por medio de análisis Western como al través de microscopía confocal, que mientras que la introducción de filamina mutante provocaba la formación de agregados insolubles en mioblastos cardíacos, la introducción de filamina normal nunca formaba estos agregados (Fig. 5).

ABAXO IZQUIERDA

Figura 4. Esquema y conservación de la filamina C.

ABAXO DERECHA

Figura 5. Expresión de filamina C mutante y análisis en cardiomiocitos por medio de microscopía confocal.



CONCLUSIONES

En conjunto, los datos derivados de este trabajo demuestran que mutaciones en el gen que codifica la filamina C (*FLNC*) se asocian a miocardiopatía hipertrófica familiar y muerte de súbito. Tales mutaciones se encuentran en estos estudios afeuten a restos que tan perfectamente conservados a lo largo de la evolución, y el estudio de la herencia en ocho familias demostró que estas mutaciones siempre segreguen con la enfermedad.

Por medio de la complementación de los estudios xenéticos con estudios funcionales con filamina C mutada en células cardíacas confirmamos que estas formas mutantes son menos estables que la filamina normal, y tienden a precipitar y formar agregados insolubles en células. Estos resultados, derivados de estudios en cultivos celulares *in vitro*, tan de acuerdo con las observaciones hechas al estudiar el tejido cardíaco de pacientes con

estas mutaciones en filamina C, por lo que parece probable que estas mutaciones contribuyan al desarrollo de la miocardiopatía cardíaca.

En conclusión, estos estudios muestran la potencia de las nuevas técnicas de secuenciación xenómica para la identificación de genes responsables de enfermedades hereditarias, y aparecen una herramienta valiosa para el diagnóstico precoz y el mejor seguimiento de estos pacientes.

Leyendas de Figuras

Figura 1. Árbol genealógico de la familia estudiada.

a), El caso índice con miocardiopatía hipertrófica, y a la que se le secuenció el exoma, se señala con una flecha. b) Electroferograma de la región de interés donde se muestra la presencia de heterocigosis de un cambio G>A, que provoca la mutación *flnc* p.A1539T.

Figura 2. Extratexa de secuenciación por lotes.

Diagrama que refleja el flujo de trabajo seguido para la identificación de variantes en genes por medio del empleo de lotes de ADN de hasta 100 pacientes distintos.

Figura 3. Inmunohistoquímica de filamina C en tejido cardíaco.

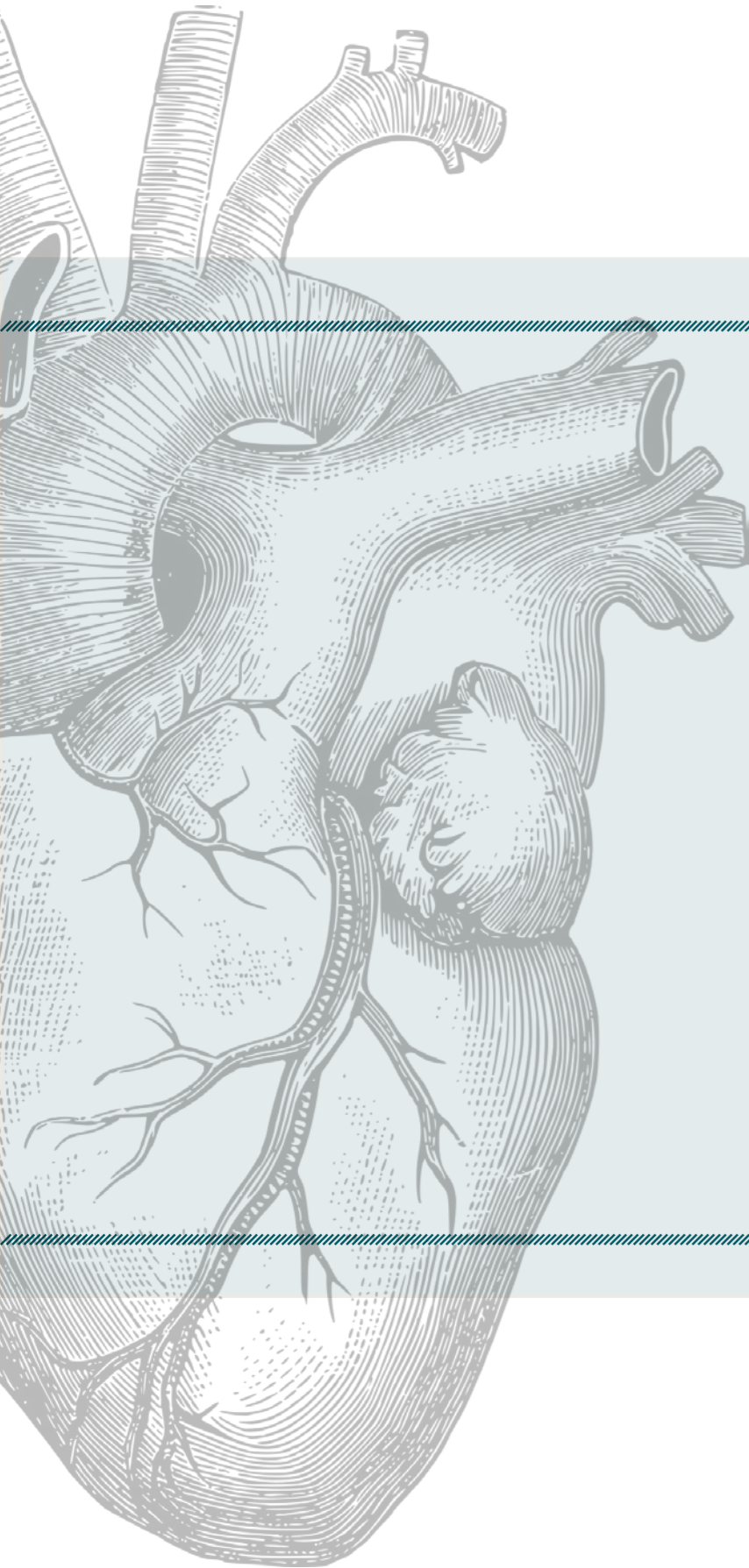
Análisis de la distribución de filamina C por medio de inmunohistoquímica en tejido cardíaco de un paciente de miocardiopatía hipertrófica con mutación en *FLNC*.

Figura 4. Esquema y conservación de la filamina C.

Esquema de la organización estructural de la filamina C (abajo) y localización de las mutaciones identificadas en pacientes con miocardiopatía hipertrófica, al igual que el alineamiento múltiple con distintas especies de vertebrados mostrando el alto grado de conservación evolutiva de dichos restos.

Figura 5. Expresión de filamina C mutante y análisis en cardiomiocitos por medio de microscopía confocal.

Con el fin de estudiar el efecto de las mutaciones en *flnc* en pacientes con miocardiopatía hipertrófica familiar, se generaron por medio de mutagénesis dirigida clones de cDNA con estas mutaciones. La introducción de estas construcciones y la su expresión en cardiomiocitos nos permite visualizar el efecto de estas mutaciones sobre la función de la proteína. La figura muestra una imagen representativa de una célula expresando *flnc* con la mutación p.V123A (izquierda) o *flnc* control (derecha). En verde se puede ver la formación de agregados de filamina C en la célula que expresa la construcción mutada p.V123A, mientras que la célula con la construcción control tiene una distribución más dispersa por todo el citoplasma. En color rojo se muestra la tinción de las fibras de actina con faloidina, y el núcleo celular se tiñe de azul (DAPI).



Referencies bibliográfiques

- ABECASIS, G. R. ET AL. (2010).- A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061-1073.
- ADZHUBEI, I. A. ET AL.(2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248-249.
- FELLIN, R., ARCA, M., ZULIANI, G., CALANDRA, S. & BERTOLINI, S.(2015).- The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene* 555: 23-32.
- GEISTERFER-LOWRANCE, A. A. ET AL.(1990).- A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62: 999-1006.
- KATHIRESAN, S. & D.SRIVASTAVA (2012).- Genetics of human cardiovascular disease. *Cell* 148: 1242-1257.
- KUMAR, P., HENIKOFF, S. & P. C. NG (2009).- Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4: 1073-1081.
- PUENTE, X. S. ET AL. (2011).- Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475: 101-105 .
- SEIDMAN, C. E. & J.G. SEIDMAN (2011).- Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ Res* 108: 743-750.
- SHERRY, S. T. ET AL. (2001).- dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29: 308-311.
- VALDES-MAS, R. ET AL. (2014).- Mutations in filamin c cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Commun* 5: 5326.
- VORGERD, M. ET AL.(2005).- A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet* 77: 297-304.