

**REPORTE DE UNA NUEVA MUTACIÓN (Val748Leu) ASOCIADA CON
MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA UBICADA EN EL DOMINIO C5 DE
LA PROTEÍNA-C DE UNIÓN A LA MIOSINA CARDÍACA (cMyBP-C)**

Rosalva Rodríguez, Ricardo Soto, Andrea Lacruz, Yoyna Rivas, Yris Flores,
Marinela Falcone, Lorenzo Álamo y Raúl Padrón

RESUMEN

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enfermedad cardíaca primaria, caracterizada principalmente por una hipertrofia del ventrículo izquierdo, cuya consecuencia más grave es la muerte súbita. Se ha asociado con mutaciones en proteínas del sarcómero, siendo las mayormente afectadas la β -miosina cardíaca y la proteína-C de unión a la miosina cardíaca (cMyBP-C). Hasta ahora, en Venezuela solo se ha realizado el diagnóstico clínico de la MCH, por lo cual decidimos realizar su estudio a nivel genético. En colaboración con la Asociación Cardiovascular Centro Occidental (ASCARDIO) se analizaron muestras de sangre de pacientes habitantes del estado Lara, Venezuela, diagnosticados clínicamente con MCH. De cada paciente y control, previo su consentimiento informado, se aisló el ADN genómico, se amplificaron por PCR los exones que conforman tres de los genes asociados con casos genéticos de MCH (MYBPC3, MYH7, MYL2) y se secuenciaron a fin de detectar posibles mutaciones. Se encontró una nueva mutación: una sustitución G>C (Val748Leu) en el exón 24 del gen MYBPC3. Utilizando la estructura atómica del dominio central C5 (PDB 1GXE) de la isoforma cardíaca humana de cMyBP-C, se ubicó esta mutación en la cadena F del dominio C5 de cMyBP-C. Esta ubicación pudiera específicamente afectar la formación del contacto FG, el cual es considerado como el paso inicial en el plegamiento del dominio C5. En consecuencia, proponemos que la alteración de dicho plegamiento pudiera estar asociada con la MCH, contribuyendo al fenotipo clínico observado.

ron por PCR los exones que conforman tres de los genes asociados con casos genéticos de MCH (MYBPC3, MYH7, MYL2) y se secuenciaron a fin de detectar posibles mutaciones. Se encontró una nueva mutación: una sustitución G>C (Val748Leu) en el exón 24 del gen MYBPC3. Utilizando la estructura atómica del dominio central C5 (PDB 1GXE) de la isoforma cardíaca humana de cMyBP-C, se ubicó esta mutación en la cadena F del dominio C5 de cMyBP-C. Esta ubicación pudiera específicamente afectar la formación del contacto FG, el cual es considerado como el paso inicial en el plegamiento del dominio C5. En consecuencia, proponemos que la alteración de dicho plegamiento pudiera estar asociada con la MCH, contribuyendo al fenotipo clínico observado.

Introducción

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enferme-

dad autosómica dominante caracterizada fenotípicamente por un desarreglo en los miocardiocitos, fibrosis intersticial

e hipertrofia del ventrículo izquierdo en ausencia de cualquier otra enfermedad cardíaca, como la hipertensión arte-

rial (Flashman *et al.*, 2004; Alcalai *et al.*, 2007). Según criterios ecocardiográficos, la prevalencia de MCH en la

PALABRAS CLAVE / cMyBP-C / Miocardiopatía Hipertrófica / Mutación / MYBPC3 /

Recibido: 13/03/2013. Modificado: 26/09/2013. Aceptado: 2/09/2013.

Rosalva Rodríguez. Biólogo, Doctor en Ciencias y Postdoctorante, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Dirección: Laboratorio de Genómica de Enfermedades Musculares, Centro de Biología Estructural (CBE), IVIC. Altos de Pipe, Estado Miranda, Venezuela. e-mail: rosvalva-rodriguez29@gmail.com
Ricardo Soto. Biólogo, Universi-

dad Central de Venezuela (UCV). Profesional en entrenamiento, CBE-IVIC, Venezuela. e-mail: ricar2045@hotmail.com
Andrea Lacruz. Biólogo, Universidad del Zulia, Venezuela. Profesional Asociado a la Investigación, CBE-IVIC, Venezuela. e-mail: Andrea_lacruz@hotmail.com
Yoyna Rivas. M.Sc. en Ciencias, Universidad de Oriente, Vene-

zuela. Profesional Asociado a la Investigación, IVIC, Venezuela. e-mail: yoynar@yahoo.com
Yris Flores. Médico Cardiólogo Adjunto. Asociación Cardiovascular Centro-Occidental (ASCARDIO). Barquisimeto-Estado Lara, Venezuela. e-mail: yrisfloresg@gmail.com
Marinela Falcone. Médico Hematólogo Adjunto, Banco de

Sangre, ASCARDIO, Venezuela. e-mail: marinelaalfalcone@hotmail.com
Lorenzo Álamo. Biólogo, UCV, Venezuela. Profesional Asociado a la Investigación, IVIC, Venezuela. e-mail: Lorenzo.alamo@gmail.com
Raúl Padrón. Doctor en Ciencias, IVIC, Venezuela. Investigador, IVIC, Venezuela. e-mail: raul.padrón@gmail.com

REPORT OF A NEW MUTATION (Val748Leu) ASSOCIATED WITH HYPERTOPHIC MIOCARDIOPATHY LOCATED IN THE C5 DOMAIN OF THE CARDIAC MYOSIN BINDING PROTEIN-C (cMyBP-C)

Rosalva Rodríguez, Ricardo Soto, Andrea Lacruz, Yoyna Rivas, Yris Flores, Marinela Falcone, Lorenzo Álamo and Raúl Padrón

SUMMARY

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a primary heart disease mainly characterized by left ventricle hypertrophy, its most serious consequence being sudden death. It has been associated to sarcomeric protein mutations, cardiac β -myosin and the cardiac myosin binding protein-C (cMyBP-C) being the most affected. Since until now, only clinical diagnostic of HCM has been performed in Venezuela, it was decided to study it at the genetic level. In collaboration with the Asociación Cardiovascular Centro Occidental (ASCARDIO), blood samples from clinically diagnosed HCM patients living in Lara state, Venezuela, were analyzed. Following informed consent, genomic DNA was isolated from each patient and control, the exons that

conform three of the genes associated with HCM (MYBPC3, MYH7, MYL2) were amplified by PCR and sequenced to detect possible mutations. A new mutation found: a substitution G>C (Val748Leu) in exon 24 of the MYBPC3 gene. Utilizing the atomic structure of the central C5 (PDB 1GXE) domain of the human cardiac isoform of cMyBP-C, the mutation was localized in the F chain of the C5 domain of cMyBP-C. This location could specifically affect the establishment of the FG contact, which is considered as the initial step in the C5 domain folding. Therefore, we propose that the alteration of such folding could be associated with HCM, contributing to the observed clinical phenotype.

RELATÓRIO DE UMA NOVA MUTAÇÃO (Val748Leu) ASSOCIADA COM MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA SITUADA NO DOMÍNIO C5 DA PROTEÍNA-C DE UNIÃO À MIOSINA CARDÍACA (cMyBP-C)

Rosalva Rodríguez, Ricardo Soto, Andrea Lacruz, Yoyna Rivas, Yris Flores, Marinela Falcone, Lorenzo Álamo e Raúl Padrón

RESUMO

A miocardiopatia hipertrófica (MCH) é uma enfermidade cardíaca primária, caracterizada principalmente por uma hipertrofia do ventrículo esquerdo, cuja consequência mais grave é a morte súbita. Tem se associado com mutações em proteínas do sarcômero, sendo as principais afetadas a β -miosina cardíaca e a proteína-C de união à miosina cardíaca (cMyBP-C). Até agora, na Venezuela somente tem sido realizado o diagnóstico clínico da MCH, pelo qual decidimos realizar seu estudo a nível genético. Em colaboração com a Associação Cardiovascular Centro Occidental (ASCARDIO) se analisaram amostras de sangue de pacientes moradores do estado Lara, Venezuela, diagnosticados clinicamente com MCH. De cada paciente e controle, prévio consentimento informado, se isolou o DNA genômico, se

amplificaram por PCR os éxons que conformam três dos genes associados a casos genéticos de MCH (MYBPC3, MYH7, MYL2) e se sequenciaram a fim de detectar possíveis mutações. Encontrou-se uma nova mutação: uma substituição G>C (Val748Leu) no éxon 24 do gene MYBPC3. Utilizando a estrutura atômica do domínio central C5 (PDB 1GXE) da isoforma cardíaca humana de cMyBP-C, se localizou esta mutação na cadeia F do domínio C5 de cMyBP-C. Esta localização poderia especificamente afetar a formação do contato FG, o qual é considerado como o passo inicial para formação de pregas do domínio C5. Em consequência, propomos que a alteração de dita formação de pregas pudera estar associada com a MCH, contribuindo ao fenótipo clínico observado.

población general es del 0,2%, (Flashman *et al.*, 2004).

La consolidación de la MCH como entidad patológica ha sido un proceso lento y difícil. Los reportes iniciales datan del siglo XVII, cuando fueron descritos casos de muerte súbita producidos por una hipertrofia ventricular no explicada con algunos síntomas tales como arritmias, obstrucción del ventrículo izquierdo, obstrucción del tracto de salida y distorsión de la válvula mitral (Hallopeau, 1869). Ulteriormente surgieron una gran cantidad de reportes de estudios histopatológicos, aparte de una serie de complicaciones adicionales, revelando la compleja heterogeneidad clínica de esta enferme-

dad; complejidad ésta que persiste aún hoy en día (Ommen, 2011). En años recientes se inició una nueva etapa en el estudio de la MCH que incluyeron las técnicas genéticas (Jarcho *et al.*, 1989, ver revisión en Maron *et al.*, 2012) y de ecocardiografía (Botstein *et al.*, 1980, Maron *et al.*, 2009). Luego, con el auge del estudio del genoma humano, se detectó la primera mutación en el gen que codifica para la miosina cardíaca (MYH7), como causante de la MCH en una familia afectada (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990). A partir de ese momento se han detectado más de 900 mutaciones asociadas a MCH (Seidman y Seidman, 2011). En vista de que una

gran parte de estas mutaciones fueron detectadas en los genes que codifican las proteínas sarcoméricas, se ha considerado a la MCH como una enfermedad del sarcómero. Casi el 50% de los casos genéticos descritos involucran el gen MYH7, así como el MYBPC3, que codifica para la proteína-C de unión a la miosina cardíaca cMyBP-C (Seidman y Seidman, 2011).

La principal controversia que existe al estudiar MCH es la de establecer una correlación fenotipo-genotipo, visto que en esta patología no parece existir, en la secuencia de los genes involucrados, un sitio específico que concentre estas mutaciones (Harris *et al.*, 2011). Además, en muchos

casos no es clara la naturaleza patológica de ellas, complicando los estudios de detección de dichas mutaciones. Se ha determinado que alteraciones de la secuencia de genes del sarcómero se asocian con el fenotipo clínico de MCH (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990; Seidman y Seidman 2011). Por ejemplo, Lys-273Glu, Ile79Asn y Phe87Leu son algunas de las mutaciones encontradas en el gen de la troponina T cardíaca y que han sido asociadas con la muerte súbita de sus portadores (Xu *et al.*, 2010), lo que refuerza la importancia de detectar mutaciones en pacientes con MCH. Otras mutaciones alteran específicamente residuos muy conserva-

dos o que están ubicados en sitios funcionales importantes de las proteínas sarcoméricas (Lossie *et al.*, 2012).

Una de las proteínas que ha despertado gran interés en los últimos años, por su asociación con casos genéticos de MCH, es la proteína MyBP-C. Descrita en preparaciones de miosina hace ya más de 40 años (Starr y Offer 1971, Offer *et al.*, 1973), la proteína MyBP-C se ha convertido actualmente en un objetivo de investigación, no solo en la búsqueda de su función fisiológica en el músculo cardíaco (Luther *et al.*, 2011) o como posible marcador de infarto cardíaco (Govindan *et al.*, 2012), sino por el gran número de mutaciones genéticas reportadas como asociadas a MCH (Harris *et al.*, 2011).

La c-MyBP-C (Figura 1) es una proteína formada por 1274 aminoácidos que contribuye a mantener la estructura del sarcómero y está formada por siete dominios del tipo inmunoglobulina de clase I (IgI) y tres dominios del tipo fibronectina tipo III (FnIII) (Flashman *et al.*, 2004). Se han descrito tres isoformas de MyBP-C: la isoforma 1, expresada en músculo esquelético lento, codificada por el gen *MYBPC1* (Gurnett, 2010); la isoforma 2, expresada en músculo esquelético rápido y codificada por el gen *MYBPC2* (Knoll, 2012); y la isoforma 3, expresada en músculo cardíaco y codificada por el gen *MYBPC3* (Oakley *et al.*, 2007; Jeffries *et al.*, 2008).

La MyBP-C presente en el músculo cardíaco (cMyBP-C) difiere de las otras dos isoformas en tres aspectos: incluye un motivo IgI adicional (denominado C0) localizado en el extremo amino-terminal (Pfuhl, 2012); presenta una inserción de 30 aminoácidos, rica en prolina, en el dominio C5 (Flashman *et al.*, 2008); y un dominio adicional (dominio m) entre los dominios C1 y C2 (Pfuhl, 2012), que contiene cuatro sitios de fosforilación (Ackermann y Kontogianni-Konstantopoulos, 2011).

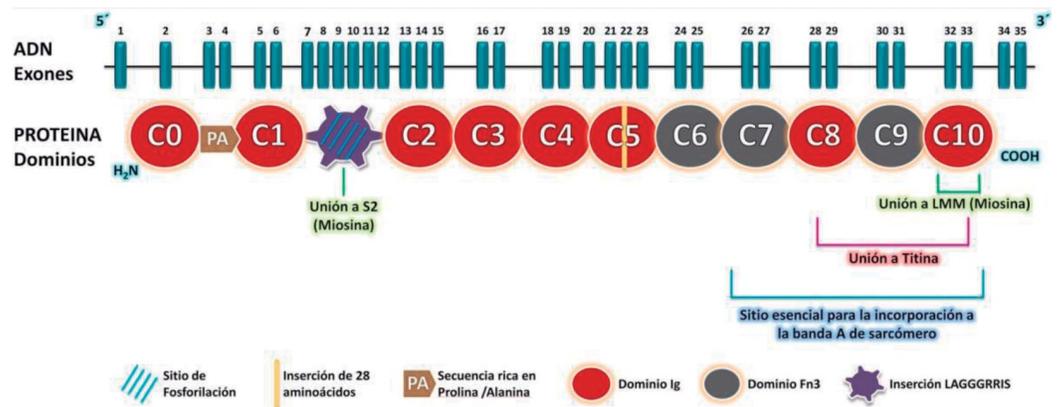


Figura 1. Representación esquemática de la organización de los 11 dominios de la proteína-C de miosina cardíaca (cMyBP-C).

Estas diferencias han sugerido que la cMyBP-C pudiera ser muy importante para el mecanismo de la contracción del músculo cardíaco (Schlossarek *et al.*, 2011).

Se han reportado 197 mutaciones en la proteína cMyBP-C (Harris, 2011) que están repartidas en todos los dominios de la proteína y no en *hotspots* en el gen. El principal efecto atribuido a estas mutaciones es la interrupción del marco de lectura de la proteína, introduciendo un codón de parada o *stop* que causa que la proteína se trunque y por ende sea de menor tamaño que la proteína original. La proteína truncada se incorpora en el sarcómero produciendo un efecto de haploinsuficiencia, lo que explicaría el fenotipo clínico observado. En general, las mutaciones encontradas en c-MyBP-C exhiben baja penetrancia y se pueden encontrar individuos con genotipo positivo que no manifiestan un fenotipo severo, siendo mayormente asociadas a una hipertrofia intermedia (Maron *et al.*, 2001; Barefiel y Sadayappan, 2010; Landstrom y Ackerman, 2010; Schlossarek *et al.*, 2011). Por estas razones, las mutaciones en cMyBP-C se consideran, en general, de carácter benigno (Maron *et al.*, 2001, Barefiel y Sadayappan 2010; Landstrom y Ackerman, 2010, Schlossarek *et al.*, 2011); no obstante, un 5,3% de las mutaciones detectadas están relacionadas

con casos de muerte súbita y pronóstico de supervivencia pesimista (Xu, *et al.*, 2010; Schlossarek *et al.*, 2011).

A pesar del avance en el estudio genético e identificación de mutaciones en diversas enfermedades, los estudios de MCH en Venezuela solamente incluyen el diagnóstico clínico de cada paciente y, hasta donde conocemos, no existen reportes de la caracterización genética de la MCH (Puigbó *et al.*, 2001). A diferencia, en otros países el diagnóstico clínico se realiza conjuntamente con la determinación de la(s) mutación(es) asociadas (Seidman y Seidman, 2011), lo cual es ventajoso para el médico tratante. La falta de información de las mutaciones asociadas a MCH en Venezuela motivó la realización del presente estudio en colaboración con la Asociación Cardiovascular Centro Occidental (ASCARDIO), con la finalidad de detectar mutaciones en los dos genes más frecuentemente alterados (*MYBPC3* y *MYH7*) y en el gen *MYL2*, que codifica para la proteína ligera reguladora (RLC) que aún teniendo menos frecuencia de mutaciones dada la función que ejerce, resulta interesante de incluir en el estudio en pacientes diagnosticados con MCH. En este trabajo reportamos una mutación nueva, una sustitución G>C (Val748Leu) en el exón 24 del gen *MYBPC3*. En nuestro conocimiento esta es

la primera mutación asociada a MCH que se ha descrito en Venezuela. En el análisis se utilizó un modelo atómico del dominio en cMyBP-C, en el cual está localizada esta mutación. Se discuten las posibles bases estructurales para asociar el cambio Val748Leu con el fenotipo clínico de MCH detectado en un paciente.

Métodos

Pacientes y controles

Se recolectaron, previo consentimiento informado de los pacientes y los individuos controles (según lo aprobado por las Comisiones de Bioética del IVIC y de ASCARDIO), un total de 100 muestras de sangre de personas genéticamente independientes: 50 de pacientes de ASCARDIO con diagnóstico clínico de MCH (31 mujeres y 19 hombres, con edades entre 13 y 83 años), más 50 muestras de personas sanas (30 mujeres y 20 hombres, con edades entre 18 y 56 años). Los pacientes que exhibieron síntomas característicos de MCH (dolor torácico, disnea de esfuerzo progresiva, alteración del estado de conciencia como presíncope y síncope) y que además presentaban un engrosamiento >13mm de cualquiera de los dos ventrículos según estudios de ecocardiografía, fueron diagnosticados como enfermos de MCH, excluyéndose aquellos con cual-

quier otra patología cardíaca, especialmente aquellas que condicionan obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo. Los controles fueron considerados sanos para enfermedades cardiovasculares en base a su ecocardiograma y los datos de la encuesta correspondiente.

Detección de mutaciones

Se extrajo el ADN de sangre recolectada de pacientes y controles, siguiendo el protocolo de Lahiri *et al.*, 1991. Estas muestras de ADN fueron utilizadas como molde para la amplificación por PCR de los exones del gen *MYBPC3*, el gen *MYL2* y el gen *MYH7*, utilizándose para ello la secuencia de los siguientes iniciadores que conforman el gen *MYBPC3*: MyBPC 2F-MyBPC 2R (exón 2), MyBPC 3F-MyBPC 3R (exón 3), MyBPC 4F-MyBPC 4R (exón 4), MyBPC 5F-MyBPC 5R (exón 5), MyBPC 6F-MyBPC 6R (exón 6), MyBPC 7F-MyBPC 7R (exón 7), MyBPC 8F-MyBPC 8R (exón 8), MyBPC 9F-MyBPC 9R (exón 9), MyBPC 10F-MyBPC 10R (exón 10), MyBPC 11F-MyBPC 11R (exón 11), MyBPC 12F-MyBPC 12R (exón 12), MyBPC 13F-MyBPC 13R (exón 13), MyBPC 14F-MyBPC 14R (exón 14), MyBPC 15F-MyBPC 15R (exón 15), MyBPC 16F-MyBPC 16R (exón 16), MyBPC 17F-MyBPC 17R (exón 17), MyBPC 18F-MyBPC 18R (exón 18), MyBPC 19F-MyBPC 19R (exón 19), MyBPC 20F-MyBPC 20R (exón 20), MyBPC 21F-MyBPC 21R (exón 21), MyBPC 22F-MyBPC 22R (exón 22), MyBPC 23F-MyBPC 23R (exón 23), MyBPC 24F-MyBPC 24R (exón 24), MyBPC 25F-MyBPC 25R (exón 25), MyBPC 26F-MyBPC 26R (exón 26), MyBPC 27F-MyBPC 27R (exón 27), MyBPC 28F-MyBPC 28R (exón 28), MyBPC 29F-MyBPC 29R (exón 29), MyBPC 30F-MyBPC 30R (exón 30), MyBPC 31F-MyBPC 31R (exón 31), MyBPC 32F-MyBPC 32R (exón 32), MyBPC 33F-MyBPC 33R (exón 33), MyBPC 34F-MyBPC 34R (exón 34), y MyBPC 35F-MyBPC 35R (exón 35) reporta-

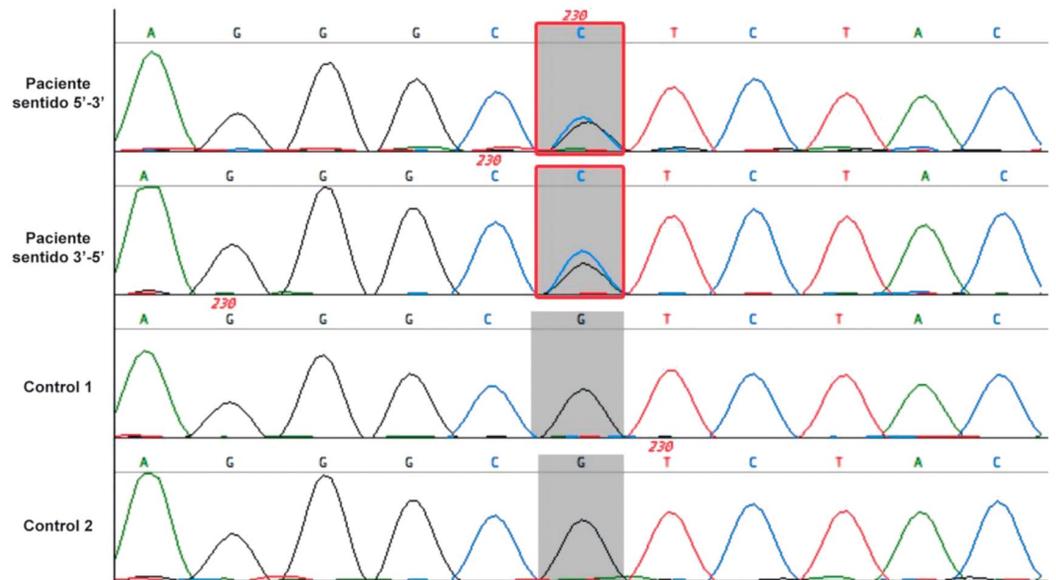


Figura 2. Electroferograma mostrando el cambio de nucleótido G>C, que traducido representa el cambio Val1748Leu del exón 24 del gen *MYBPC3*. En recuadro gris con borde rojo se aprecia el pico correspondiente a la sustitución del nucleótido G>C, observada en el paciente en ambos sentidos de la secuencia (5'-3' y 3'-5'), en condición heterociga, versus la secuencia de dos controles diferentes (Control 1 y 2) en sentido 5'-3', como un pico único negro en el recuadro gris sin borde.

da en <http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home> (Harvard College. Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School).

La mezcla de reacción de PCR estuvo compuesta de 10-40ng de ADN genómico, 0,2µM de cada uno de los iniciadores, 0,5-1U de la enzima Taq ADN polimerasa, 2µM de dNTP, 1X del tampón de PCR en un volumen final de 100µl. La incubación de la reacción de PCR incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5min seguido de 35 ciclos de incubación a 95°C por 1min, seguido de 54-65°C por 1min y 72°C por 5min, y una incubación final a 72°C por 10min. Las temperaturas de hibridación para cada exón del gen *MYBPC3* fueron 62,7°C para los exones: 2, 3, 5, 7-9, 11, 12, 14-16, 19, 26 y 31-33; y 62°C para los exones 4, 6, 10, 13, 17, 18, 20-25, 27-30, 34 y 35. Los fragmentos obtenidos para cada exón fueron purificados utilizando un kit comercial (AxyPrep™ Blood Genomic DNA Mini-prep Kit), y enviados a se-

cuenciar a MacroGen Korea (Seul, Korea).

Análisis de secuencia

El alineamiento múltiple de secuencias de ADN se realizó con el programa Mac Vector 11.1.2, utilizándose las secuencias de ADN obtenidas del paciente o control versus la secuencia nucleotídica del exón y de la proteína c-MyBP-C obtenida de la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) a los fines de identificar la mutación.

Modelaje molecular

Se utilizó el software Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) para visualizar el dominio central C5 de la isoforma cardíaca de MyBP-C del alelo salvaje (PDB 1GXE; Idowu *et al.*, 2003) y el alelo de la mutación encontrada.

Resultados y Discusión

Se analizaron 100 muestras de ADN obtenidas a partir de sangre total, divididas en 50 pacientes diagnosticados clínicamente con la enfermedad y 50 controles. Se detectó en un paciente femenino de 61 años

de edad una mutación en el exón 24, que involucra un cambio nucleotídico de c.15064 G>C, que genera un cambio de Val por Leu en la posición 748 dentro del dominio C5 de la proteína de unión a miosina C (Figuras 2 y 3).

Este cambio fue considerado patológico dado que fue encontrado en un paciente con sintomatología clínica para MCH y no se detectó en las personas del grupo control. La paciente fue diagnosticada a los 49 años de hipertensión con sospechas de MCH. La clínica incluyó síntomas de disnea de esfuerzo clase NYHAI, un grosor de septum IV (de 23mm), pared inferolateral de 23mm con obstrucción en el tracto de salida de VI (gradiente espontáneo de 86mm Hg) y, además hipertrofia del ventrículo derecho. Por estas razones se diagnosticó como un caso de miocardiopatía hipertrófica simétrica obstructiva. En el estudio de ritmo cardíaco (Holter 24h) se evidenciaron ectópicos ventriculares y episodios de taquicardia ventricular que le conferían riesgo elevado de muerte súbita.

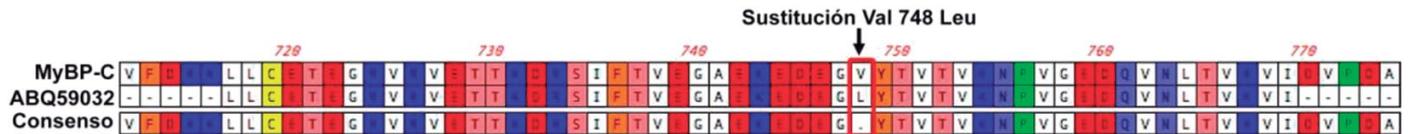


Figura 3. Alineamiento de la secuencia de la proteína cMyBP-C del paciente vs la secuencia de la proteína cMyBP-C depositada en la base de datos de NCBI (ABQ59032.1), donde se señala el cambio de aminoácidos Val748Leu.

Se considera que la proteína cMyBP-C tiene una función de tipo estructural y funcional en el mantenimiento del sarcómero, y que ejerce su función por su interacción con otras proteínas de interés como la miosina y la actina, regulada por su estado de fosforilación. Aun no ha sido descrito el mecanismo de interacción entre la proteína cMyBP-C y el resto de las proteínas del sarcómero (Pfuhl *et al.*, 2012). Lo que sí está claro es la relación directa entre la presencia de mutaciones en la proteína cMyBP-C y el fenotipo clínico de MCH, sustentado en numerosas publicaciones (Marston *et al.*,

2012; Vydyanath *et al.*, 2012; Camuglia *et al.*, 2013; De Lange *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2013; Reguero *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

En este estudio, la mutación detectada está ubicada en el dominio C5, específicamente en la posición 748, consistente en un cambio de Val por Leu. El dominio C5 en la isoforma cardíaca de MyBP-C tiene dos características estructurales: 1) un enlace entre el dominio C4-C5, formado por ~10 residuos de aminoácidos; y 2) una inserción de ~30 aminoácidos en el bucle CD, que aumenta a 39 aa. En el trabajo de Idowu *et al.*

(2003) se realizó un análisis de la dinámica molecular de este dominio, describiéndose este bucle CD como desestructurado y flexible.

Para tratar de determinar el papel de la mutación encontrada en la estructura del dominio C5 cardíaco y considerando que los estudios estructurales y funcionales de la proteína cMyBP-C se han concentrado en las regiones N-terminal (exones C0-C3) y C-terminal (exones C7-C10) (Figura 1) y que existe poca información estructural o funcional de los dominios C4, C5 y C6, hemos substituido la Val en la posición 748 por una Leu en el dominio C5

cardíaco cuya estructura atómica fue obtenida originalmente por resonancia magnética nuclear (RMN) y depositada en el PDB con el código 1XGE (Idowu *et al.*, 2003). La mutación encontrada Val748Leu, se ubica al inicio de la lámina beta F enfrentando al bucle CD (Figuras 4 y 5). Esta mutación involucra cambios entre aminoácidos hidrofóbicos con una estructura química similar. A pesar de que esta mutación no está ubicada en sitios claves de interacción, su ubicación frente al bucle CD (Figura 5), que en el caso del músculo cardíaco es característicamente grande (Idowu *et al.*, 2003),

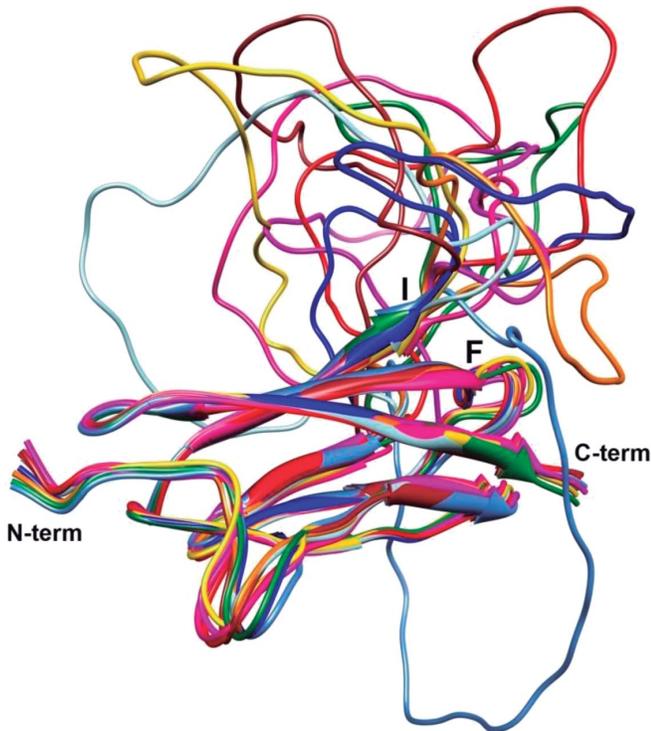


Figura 4. Estructura del dominio C5 de cMyBP-C humano (PDB 1XGE) (Idowu *et al.*, 2003) utilizando los 10 modelos superpuestos obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN). Se destaca el inicio (I) y el final (F) de una región variable que corresponde al bucle CD (en azul oscuro) de 39 aa incluyendo una inserción de 30 aminoácidos. N-term: extremo amino terminal, C-term: extremo carboxilo terminal.

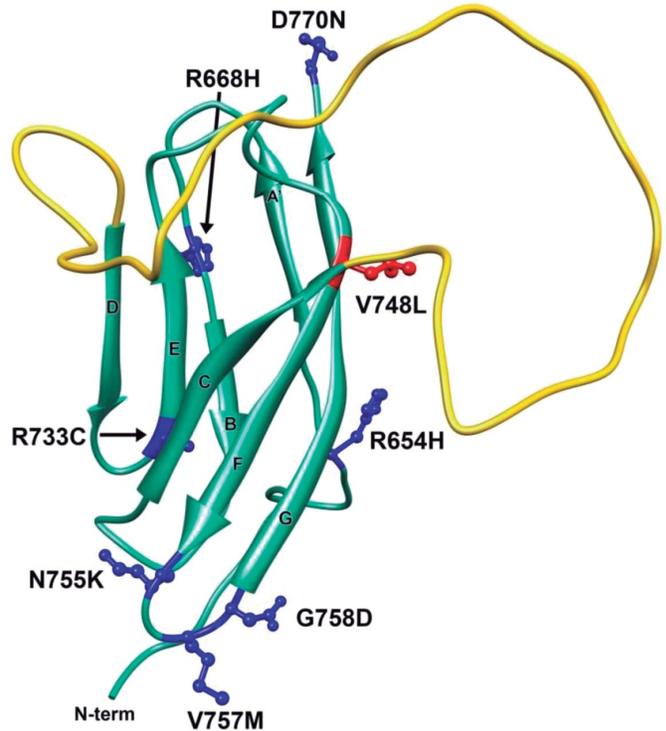


Figura 5. Modelo del dominio C5 de cMyBP-C humano (PDB 1XGE) (Idowu *et al.*, 2003) mostrando algunas de las mutaciones más relevantes relacionadas con casos genéticos de MCH (residuos con cadenas lateral en azul) al igual que la mutación descrita en este trabajo Val748Leu (residuo con la cadena lateral en rojo) ubicada frente al bucle CD (en amarillo). Las cadenas beta se indican con las letras A-G.

probablemente induce algún grado de desestabilización estructural.

En el dominio C5 han sido descritas varias mutaciones y se sabe, por ejemplo, que mutaciones como Asn755Lys (Figura 5) han demostrado estar asociadas a un fenotipo clínico severo. Según estudios de Idowu *et al.* (2003) esto se debe al tipo de estructura donde se ubica esta mutación Asn755Lys. De acuerdo a estos investigadores, esta mutación Asn755Lys se localiza en un espacio específico del bucle FG, el cual está caracterizado por la presencia de aminoácidos altamente conservados. Al cambiar Asn por un aminoácido cargado, como lo es Lys, se modifican las interacciones locales e igualmente se crean restricciones en el espacio por la presencia de un aminoácido con un grupo radical más grande, lo que probablemente explica el fenotipo clínico severo asociado a esta mutación (Idowu *et al.*, 2003).

Hasta ahora no se ha determinado la función de las mutaciones en el desarrollo de la hipertrofia, porque no existe un modelo que pueda explicar con exactitud el mecanismo de la contracción muscular en corazón. Uno de los modelos más recientes que define mejor la interacción actina-miosina-proteína cMyBP-C, es el desarrollado por Luther *et al.* en 2011. Estos autores utilizaron la técnica de tomografía electrónica para estudiar músculo esquelético de rana. Sus resultados sugieren que en estado relajado el extremo C-terminal de la proteína MyBP-C se une longitudinalmente a lo largo del filamento grueso, mientras que su extremo N-terminal hace contacto con el filamento delgado. Esto tiene un efecto significativo, porque el extremo N-terminal establece entonces contacto con la miosina y la actina, que son interacciones que contribuyen al mecanismo de contracción y relajación del músculo (Luther *et al.*, 2011). Es de hacer notar, que los modelos desarrollados hasta ahora no explican el papel de

los dominios C5-C7 de la proteína c-MyBP-C, donde se ubica la mutación descrita en este trabajo.

Guardiani *et al.* estudiaron en el 2007 las mismas mutaciones que Idowu *et al.* en el 2003, pero por dinámica molecular, a fin de determinar los pasos de plegamiento del dominio C5; los bucles DE y FG son los primeros que inician el proceso de plegamiento, seguidos por los bucles CD y EF. La mutación Asn755Lys, detectada en un paciente con síntomas severos de MCH, se ubica en la región del bucle FG no exactamente en la zona crítica de formación del bucle, sino en la cadena F y en frente del bucle CD. Esto pudiera implicar que esta mutación está involucrada en las interacciones con el bucle CD, induciendo su desestabilización en el primer paso del plegamiento del dominio C5. Una limitación del presente estudio fue la falta de una descripción de la historia familiar y del árbol genealógico del paciente. Esta información, que escapa del objetivo del trabajo, hubiese permitido definir mejor el carácter patológico de esta mutación. Otra limitación fue la falta de una búsqueda de mutaciones en el resto de genes que conforman el sarcómero, y que han demostrado estar asociadas con esta patología cardíaca. Por esto no es posible asumir que la mutación encontrada en el gen *MYBPC3* sea la única responsable del fenotipo clínico, visto que se conoce que la presencia de más de una mutación afecta de manera negativa la expresión de la enfermedad.

Conclusiones

Reportamos una nueva mutación, una sustitución G>C (Val748Leu) en el exón 24 del gen *MYBPC3* en una paciente con diagnóstico de miocardiopatía hipertrofica. Esta es la primera mutación asociada con la enfermedad que ha sido descrita en Venezuela, y se ubica en la cadena F del

dominio 5 de cMyBP-C, por lo cual sugerimos pudiera afectar la formación del contacto de este dominio con el dominio vecino G, paso inicial del pegamiento de ambos dominios. Proponemos que la alteración de dicho plegamiento pudiera estar asociada con MCH, contribuyendo al fenotipo clínico observado.

Agradecimientos

Las figuras 4 y 5 fueron producidas usando el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) del Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, Universidad de California, San Francisco (financiado por NIH P41 RR-01081). El presente trabajo fue subvencionado por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (RR #973, RP #638), Industrias Farmacéuticas Konsuma y Helmerich (RR), y el Howard Hughes Medical Institute (RP).

REFERENCIAS

- Ackermann MA, Kontrogianni-Konstantopoulos A (2011) Myosin binding protein-C: a regulator of actomyosin interaction in striated muscle. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: 1-9.
- Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE (2008) Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 19: 104-110.
- Barefield D, Sadayappan S (2010) Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48: 866-875.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Camuglia AC, Younger JF, McGaughan J, Lo A, Atherton JJ (2013) Cardiac myosin-binding protein C gene mutation expressed as hypertrophic cardiomyopathy and left ventricular noncompaction within two families: Insights from cardiac magnetic resonance in clinical screening: MYBPC3 gene mutation and MRI. *Int. J. Cardiol.* S0167-5273(13)00713-4.
- De Lange WJ, Grimes AC, Hegge LF, Spring AM, Brost TM,

Ralphe JC (2013) E258K HCM-causing mutation in cardiac MyBP-C reduces contractile force and accelerates twitch kinetics by disrupting the cMyBP-C and myosin S2 interaction. *J Gen Physiol.* 142: 241-255.

- Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H (2004) Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ. Res.* 94: 1279-1289.
- Flashman E, Korkie L, Watkins H, Redwood C, Moolman-Smook JC (2008) Support for a trimeric collar of myosin binding protein C in cardiac and fast skeletal muscle, but not in slow skeletal muscle. *FEBS Lett.* 582: 434-438.
- Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62: 999-1006.
- Govindan S, McElligott A, Muthusamy S, Nair N, Barefield D, Martin JL, Gongora E, Greis KD, Luther PK, Winegrad S, Henderson KK, Sadayappan S (2012) Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52: 154-164.
- Guardiani C, Cecconi F, Livi R (2008) Stability and kinetic properties of C5-domain from myosin binding protein C and its mutants. *Biophys. J.* 94: 1403-1411.
- Gurnett CA, Desruisseau DM, McCall K, Choi R, Meyer ZI, Talerico M, Miller SE, Ju JS, Pestronk A, Connolly AM, Druley TE, Wehl CC, Dobbs MB (2010) Myosin binding protein C1: a novel gene for autosomal dominant distal arthrogyrosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* 19: 1165-1173.
- Hallopeau M (1869) Retrecissement cardiaque sous-aortique. *Gaz. Med. Paris.* 24: 683-687.
- Harris SP, Lyons RG, Bezold KL (2011) In the thick of it: HCM-causing mutations in myosin binding proteins of the thick filament. *Circ. Res.* 108: 751-764.
- Idowu SM, Gautel M, Perkins SJ, Pfuhl M (2003) Structure, stability and dynamics of the central domain of cardiac myosin binding protein C (MyBP-C): implications for multidomain assembly and causes for cardiomyopathy. *J. Mol. Biol.* 329: 745-761
- Jarcho JA, McKenna W, Pare JA, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, Levi T, Donis-Keller

- H, Seidman JG, Seidman CE (1989) Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N. Engl. J. Med.* 321: 1372-1378.
- Jeffries CM, Whitten AE, Harris SP, Trehwella J (2008) Small-angle X-ray scattering reveals the N-terminal domain organization of cardiac myosin binding protein C. *J. Mol. Biol.* 377: 1186-1199.
- Knoll R (2012) Myosin binding protein C: Implications for signal transduction. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33: 31-42.
- Lahiri De, Nurnberger J (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic. Acids Res.* 19: 5444.
- Landstrom AP, Ackerman MJ (2010) Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 122: 2441-2449.
- Liu W, Liu W, Hu D, Zhu T, Ma Z, Yang J, Xie W, Li C, Li L, Yang J, Li T, Bian H, Tong Q (2013) Mutation spectrum in a large cohort of unrelated chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 112: 585-589.
- Lossie J, Ushakov DS, Ferenczi MA, Werner S, Keller S, Haase H, Morano I (2012) Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. *Cardiovasc. Res.* 93: 390-396.
- Luther PK, Winkler H, Taylor K, Zoghbi ME, Craig R, Padrón R, Squire JM, Liu J (2011) Direct visualization of myosin-binding protein C bridging myosin and actin filaments in intact muscle. *PNAS* 108: 11423-11428.
- Maron BJ, Niimura H, Casey SA, Soper MK, Wright GB, Seidman JG, Seidman CE (2011) Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38: 315-321.
- Maron BJ, Maron MS, Wigle ED, Braunwald E (2009) The 50-year history, controversy, and clinical implications of left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy from idiopathic hypertrophic subaortic stenosis to hypertrophic. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54: 191-200.
- Marston S, Copeland O, Gehmlich K, Schlossarek S, Carrier L (2012) How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33: 75-80.
- Meyer T, Pankuweit S, Richter A, Maisch B, Ruppert V (2013) Detection of a large duplication mutation in the myosin-binding protein C3 gene in a case of hypertrophic cardiomyopathy. *Gene* 527: 416-420.
- Oakley CE, Chamoun J, Brown LJ, Hambly BD (2007) Myosin binding protein-C: enigmatic regulator of cardiac contraction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 2161-2166.
- Offer G, Moos C, Starr R (1973) A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification and characterization. *J. Mol. Biol.* 74: 653-676.
- Ommen SR (2011) Hypertrophic cardiomyopathy. *Curr. Probl. Cardiol.* 36: 409-453.
- Petersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605-1612.
- Pfuhl M, Gautel M (2012) Structure, interactions and function of the N-terminus of cardiac myosin binding protein C (MyBP-C): who does what, with what, and to whom? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33: 83-94.
- Puigbó JJ, Combellas I, Giordano H, Acquatella H, Gómez JR, Casal H, Tortoledo F, Suárez C (2001) Estudio sobre la miocardiopatía hipertrófica: aspectos clínicos, ecocardiográficos, hemodinámicos y angiocardiográficos en una serie de treinta pacientes. *Gac. Méd. Caracas* 109: 488-496.
- Reguero JR, Gómez J, Martín M, Flórez JP, Morís C, Iglesias S, Alonso B, Alvarez V, Coto E (2013) The G263X MYBPC3 mutation is a common and low-penetrant mutation for hypertrophic cardiomyopathy in the region of Asturias (Northern Spain). *Int. J. Cardiol.* S0167-5273.
- Schlossarek S, Mearini G, Carrier L (2011) Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Mol. Cell Cardiol.* 50: 613-620.
- Seidman CE, Seidman JG (2011) Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ. Res.* 108: 743-750.
- Starr R, Offer G (1971) Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS Lett.* 15: 40-44.
- Vydyanath A, Gurnett CA, Marston S, Luther PK (2012) Axial distribution of myosin binding protein-C is unaffected by mutations in human cardiac and skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33: 61-74.
- Wang Y, Wang Z, Yang Q, Zou Y, Zhang H, Yan C, Feng X, Chen Y, Zhang Y, Wang J, Zhou X, Ahmad F, Hui R, Song L (2013) Autosomal recessive transmission of MYBPC3 mutation results in malignant phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* 8: e67087.
- Xu Q, Dewey S, Nguyen S, Gomes AV (2010) Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48: 899-909.