

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización funcional de mutaciones en el gen *MYH7* en pacientes con miocardiopatía hipertrófica (MCH)

Autor:

Javier Errea Dorronsoro

Directora:

Guiomar Perez de Nanclares Leal

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Definición clínica.....	1
1.2. Impacto de la genética.....	2
1.3. Producto del gen <i>MYH7</i>	3
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1. Extracción de DNA.....	4
3.2. Amplificación del fragmento deseado y validación.....	5
3.3. Limpieza del producto de la PCR y reacción de secuenciación.....	7
3.4. Purificación y análisis en el secuenciador.....	7
4. RESULTADOS.....	8
4.1. Resultado de la amplificación por PCR.....	8
4.2. Resultado de la secuenciación.....	9
4.3. Estudios <i>in silico</i>	11
5. DISCUSIÓN.....	11
6. CONCLUSIONES.....	14
REFERENCIAS.....	14

1. INTRODUCCIÓN

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enfermedad cardíaca genética que se caracteriza por un engrosamiento anómalo y patogénico de las paredes del corazón. Si bien es verdad que cualquier segmento del miocardio puede verse afectado por este engrosamiento, se ha visto que el tipo de miocardiopatía hipertrófica más relevante es la de ventrículo izquierdo. Diversos estudios epidemiológicos revelan que, solamente en Estados Unidos, la miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo afecta a más de 600.000 personas, lo que significa que nos encontramos ante una importante enfermedad que cuenta con una prevalencia relativamente alta: 0,2% (1:500)¹.

1.1. Definición clínica

La heterogeneidad que presenta esta enfermedad y las dificultades que presenta su caracterización han favorecido que, a lo largo de la historia, la miocardiopatía hipertrófica haya ido cambiando de nomenclatura. Como ejemplo de la nomenclatura que se usaba en los años 60 y 70 para esta enfermedad encontramos estenosis hipertrófica subaórtica idiopática (IHSS: *idiopathic hypertrophic subaortic stenosis*) o miocardiopatía hipertrófica obstructiva (HOCM: *hypertrophic obstructive cardiomyopathy*)². Esta poca consistencia a la hora de referirse a la enfermedad ha generado la necesidad de aunar conceptos y construir una definición sólida y general de lo que es la miocardiopatía hipertrófica o MCH. En la actualidad, la MCH se define como un estado patológico caracterizado por la hipertrofia del ventrículo izquierdo debida a un engrosamiento de la pared cardíaca superior a 15mm y asociado con un mantenimiento normal del volumen de la cavidad ventricular izquierda³.

Otros parámetros a tener en cuenta para caracterizar clínicamente la MCH son las alteraciones fisiopatológicas que acompañan a la enfermedad. Uno de los signos más característicos de MCH es la obstrucción del flujo ventricular izquierdo⁴, que viene generada por la rigidez y obstaculización mecánica causada por un miocardio excesivamente grueso y con contractilidad reducida. Esta obstaculización del flujo sanguíneo genera problemas asociados tales como una excesiva prolongación del tiempo de relajación ventricular, elevación de la presión diastólica del ventrículo izquierdo, regurgitación mitral, isquemia del miocardio que puede acabar en infarto y, en definitiva, un descenso en el gasto cardíaco general^{4,5}. Además, la MCH viene acompañada de una disfunción diastólica general que está causada por la excesiva rigidez del miocardio hipertrofiado⁴ y una disfunción autónoma que viene dada por

una respuesta sistémica anómala a los cambios en la presión sanguínea, siendo este efecto más notorio en individuos que realizan ejercicio físico⁶. Además, dado que la miocardiopatía hipertrófica se caracteriza por un engrosamiento del músculo cardíaco, clínicamente puede confundirse con otras alteraciones que también causen hipertrofia tales como la hipertrofia secundaria al deporte o la hipertrofia secundaria a la hipertensión.

Todas estas alteraciones fisiológicas hacen que los pacientes con MCH presenten intensos dolores torácicos, fatiga, mareos, pérdidas de consciencia (sobre todo a la hora de realizar actividades que requieran un esfuerzo físico importante), palpitaciones e incluso la muerte.

1.2. Impacto de la genética

El carácter heterogéneo de la miocardiopatía hipertrófica viene dado por su naturaleza genética. Con el tiempo se han ido describiendo las diversas alteraciones genéticas que causan MCH y se ha visto que, si bien pueden darse en genes diferentes, todas las mutaciones producen el mismo fenotipo (heterogeneidad genética) ya que afectan a genes que codifican para las proteínas que forman el sarcómero. Aunque puede haber más, se han descrito más de 1400 mutaciones en 8 genes de suma importancia para el correcto funcionamiento del sarcómero y que son la causa directa de la MCH. Los principales genes sarcoméricos asociados a esta patología se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Frecuencias de las mutaciones en los 8 genes más frecuentes de la MCH^{7,8}.

% de casos de MCH	Gen	Proteína
40%	<i>MYH7</i>	Cadena pesada de la miosina 7
40%	<i>MYBPC3</i>	Proteína C de unión a miosina
5%	<i>TNNT2</i>	Troponina T, tipo cardíaco
5%	<i>TNNT3</i>	Troponina I, tipo cardíaco
2%	<i>TPM1</i>	Cadena alfa-1 de la tropomiosina
1%	<i>MYL3</i>	Cadena ligera de la miosina
Desconocido	<i>MYL2</i>	Cadena ligera reguladora de la miosina, isoforma ventricular/cardíaca
Desconocido	<i>ACTC1</i>	Actina, tipo cardíaco

A pesar de haberse descrito como entidad de herencia autosómica dominante, el 5% de los pacientes con MCH presentan dos o más mutaciones en el mismo gen o en diferentes genes⁹. Además, diversos estudios han demostrado que la MCH presenta penetrancia incompleta, es decir, ausencia de expresión clínica en presencia de una mutación, generalmente asociada a la edad. Estas características complican la caracterización y validación de la patogenicidad de las mutaciones noveles identificadas.

También cabe mencionar que la miocardiopatía hipertrófica cuenta con una forma familiar y una no familiar. Si bien la variante familiar es la más común, la MCH puede aparecer en pacientes sin antecedentes familiares y puede deberse a mutaciones *de novo*¹⁰ o a pacientes con historias familiares erróneas o incompletas. Por todo ello, es fundamental realizar una historia familiar completa de los pacientes antes de comenzar los testados genéticos que, junto con un pedigrí, puede facilitar tanto el diagnóstico como el pronóstico de la enfermedad. Junto a esto, cabe mencionar que el análisis genético puede ayudar a confirmar que la hipertrofia del miocardio se debe a MCH y no a otros trastornos cardiacos tales como la hipertrofia secundaria al deporte o la hipertrofia secundaria a la hipertensión.

1.3. Producto del gen MYH7

De todos los genes implicados en la miocardiopatía hipertrófica los más relevantes son el gen *MYH7* y el gen *MYBPC3*, tal y como se muestra en la tabla 1. En adelante, este trabajo se centrará en el gen *MYH7* ya que ha sido el elegido como el objeto de estudio.

El gen *MYH7* (Ensembl: ENSG00000092054) es un gen codificante de proteína que se encuentra en el cromosoma 14 humano en el locus 14q11.2. Cuenta con una largura total de 22.980 bases y está compuesto por 40 exones (de los cuales 38 son codificantes; del exón 2 al 39) y 39 intrones. Tras ser transcrito, genera un mRNA (Ensembl: ENST00000355349) de 6087 pares de bases que codifica la cadena pesada de la miosina 7, la cual cuenta con una longitud de 1935 residuos (UniProtKB: P12883) y se expresa principalmente en las células del tejido muscular estriado cardiaco.

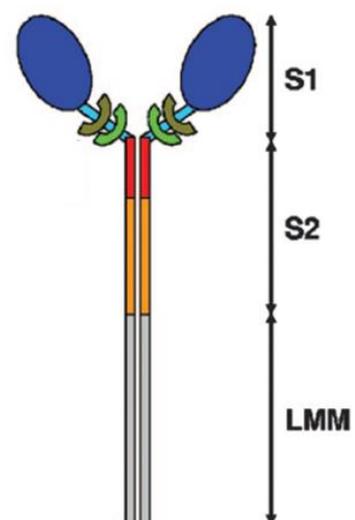


Figura 1. Estructura de la miosina¹¹.

En la figura 1 se muestra la estructura esquematizada de la miosina. La miosina cuenta con varios dominios estructurales: el dominio globular S1 en el que se encuentran las regiones de unión a actina, ATP y a calcio (forma la cabeza), el dominio S2 que forma la primera parte de la cola o *rod* de la miosina y el dominio LMM (*light meromyosin*), que abarca la gran mayoría del *rod* y que se empaqueta, junto con los dominios LMM de las demás miosinas, formando el filamento grueso del sarcómero¹¹. Toda la carga funcional de la miosina reside en el dominio S1 mientras que al *rod* (dominios S2 y LMM) se le atribuye una función meramente estructural.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es analizar el gen *MYH7* de pacientes con MCH diagnosticada clínicamente. Se pretende analizar el gen *MYH7* de dichos pacientes por métodos de secuenciación de DNA de con el objetivo de encontrar alteraciones en la secuencia que puedan estar causando la patología. También se pretende discutir y evaluar el impacto que puedan tener las mutaciones que se hallen (si se hallan) en la estructura y función de la proteína desde el punto de vista bioquímico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para 27 pacientes con miocardiopatía hipertrófica (MCH0001 – MCH0027) se realizó el estudio del gen *MYH7* mediante el siguiente procedimiento:

3.1. Extracción de DNA

El DNA se extrajo de la sangre obtenida de los pacientes mediante el protocolo establecido para el robot de extracción de DNA QIAcube. Para cada paciente se realizó la extracción sobre 200µl de sangre y se eluyó el DNA extraído en 100µl de tampón TE. La pureza, calidad y concentración del DNA extraído se testaron con un analizador espectrofotométrico NanoVue Plus midiendo el ratio de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

3.2. Amplificación del fragmento deseado y validación

Una vez obtenido el DNA de cada paciente, se procedió a amplificar la región de interés (el gen *MYH7*) por medio de PCR. El gen *MYH7* cuenta con 38 exones codificantes (del 2 al 39). Los exones cortos separados por un intrón de secuencia corta pudieron ser amplificados juntos, generando los 27 fragmentos que se muestran en la tabla 2. Las parejas de *primers* se diseñaron atendiendo a dos criterios generales: I) ambos *primers* deben hibridar en las regiones intrónicas colindantes a los exones y II) las temperaturas de hibridación para el *forward* y el *reverse* deben ser similares (no más de 5°C de diferencia). Para finalizar, a todos los *primers* se les añadió una secuencia al principio que corresponde a un fragmento conocido de DNA del virus bacteriófago M13 y que se usó para su posterior secuenciación.

Tabla 2. Composición de exones de los 27 fragmentos amplificados junto con los primers utilizados.

Fragmentos		Primers	Tª de hibridación (°C)	Ciclos de PCR
E02	Forward	GGTGCTAGGTTTTGGGGCT	57,6	35
	Reverse	GGCATGGGGCATGGGTGT	62,6	
E03	Forward	CCAACTCCTAACCTCTTGA	56,3	35
	Reverse	GCTCCTGGGGTGGACATGGA	61,3	
E04+05	Forward	GGGACTGGCATTACTCAGA	56,2	35
	Reverse	GGGAAAGAGGCTGAGTCTA	61,2	
E06+07+08	Forward	CCAGGCATTCTCTCCTGA	56,4	35
	Reverse	GGTCAAGACCAGATGGTCT	61,4	
E09+10	Forward	CCAACTAGTCTCTCTGGCT	56	35
	Reverse	GCTTTTGGACCCCTGT	61	
E11	Forward	GGGATTAAGGAGACAAGT	54,8	35
	Reverse	GCAGACATGGCCCTCCAT	59,8	
E12+13	Forward	GATTACAGGCATGAACCA	55,2	35
	Reverse	CCACTGCCTTCCCATGT	60,2	
E14	Forward	GGAAGCCCTCCTTCACT	56,5	35
	Reverse	CCAAGGGCTCGGATCCT	61,5	
E15	Forward	CCAACATGGCACCTCCA	55,1	35
	Reverse	GGTGTAGCAATTGACCT	60,1	
E16+17	Forward	CCTACCTCCCCACACTGA	55,9	35
	Reverse	GGAGATGTCTAGGAGGT	60,9	
E18+19	Forward	GGATCAGAACCCAGAACT	55,6	35
	Reverse	GCATCAGAGGAGTCAATGGA	60,6	
E20	Forward	CCTAAGGTAATCCCCACCA	56,3	35
	Reverse	CCTGACACTGCCCTGA	61,3	
E21	Forward	GGGATGAAGGAAATGGGA	55,6	35
	Reverse	CCTCTGACTGAAGGAACA	60,6	

E22	Forward	CCTCCTATTTGAGTGATGT	54,9	35
	Reverse	GGTCAGTATGGTCTGAGA	59,9	
E23	Forward	CCCACAGATGGCACCAA	55,9	35
	Reverse	GCACAGATAGACATGGCA	60,9	
E24	Forward	CCTGAGGTAACCTGAACAACA	55,9	35
	Reverse	GCGTGAGGTTGTTGCCT	60,9	
E25	Forward	GCACTCCTCCCATTACA	55,2	35
	Reverse	CCTGTAATGCTGTGAACA	60,2	
E26	Forward	CCAGAGAAGCCGAGAGCCT	56,4	35
	Reverse	GGACAGAAAGGGGAGGT	61,4	
E27+28	Forward	GCACCTCTTACACCCCT	55,8	35
	Reverse	GCAAGGCTAGTCAGTGT	60,8	
E29	Forward	CCAAGGGATGATGTTGA	55	35
	Reverse	GCTGAGTCCTGCCTGCA	60	
E30	Forward	GGTTCATGTTGTTTCCT	54,5	35
	Reverse	GGCTCTGGCCTCTCACT	59,5	
E31+32	Forward	CCTGGAGGTGGGGGAGGA	58	35
	Reverse	GGCTCTGGGGATGGGACA	63	
E33	Forward	CCACTCTTGAAGTCACT	54,8	35
	Reverse	GGAATCTGGTGCCTGTA	59,8	
E34+35	Forward	GTGAAGGGAACCGAGGCT	57,4	35
	Reverse	CCAGCCCACGGAGAGACA	62,4	
E36	Forward	CGATCCAGACCAGTGTCTCT	55,2	35
	Reverse	GCTAAGAGCAAACCTCTTCA	60,2	
E37+38	Forward	GGATATCAGATGAAGCA	54	35
	Reverse	GGTTTGAGGGTGCTCT	59	
E39	Forward	CCATCAGACCCCTCTCA	56,2	35
	Reverse	GCATTTCCACCTCCCCT	62,2	

Una vez diseñados los *primers*, se procedió a la amplificación de los fragmentos por PCR. Los 27 fragmentos se amplificaron para cada paciente en un termociclador BioRad C1000 bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (95°C – 5min), 35 ciclos (desnaturalización: 95°C - 30s; hibridación: Tª específica para cada pareja de *primers* – 30s; extensión: 72°C – 30s), extensión final (72°C – 7min) y reposo a 4°C. Las condiciones en la mezcla de PCR fueron las siguientes para cada tubo de reacción (volumen final en cada tubo: 10µl): 3,25µl de H₂O MiliQ, 1µl de tampón Taq 10X (concentración final: 1X), 2µl de DNA, 0,4µl de Mg⁺² a 50mM (concentración final: 2mM), 0,25µl de dNTPs a 10mM (concentración final: 0,25mM), 3µl de primers a 2,5µM (concentración final: 0,83µM) y 0,1µl de Taq polimerasa a 5u/µl. Algunos de los fragmentos precisaron de DMSO para su correcta amplificación. También

se preparó un tubo que no contenía DNA y que se usó como control negativo de la amplificación.

Tras la PCR se comprobó la correcta amplificación de los fragmentos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE. El tamaño de los fragmentos se comparó con un marcador de talla de 1Kb.

3.3. Limpieza del producto de la PCR y reacción de secuenciación

Tras la amplificación se procedió a la limpieza de los productos de la PCR y a la realización de la reacción de secuenciación. En primer lugar, en la reacción de limpieza, se eliminaron los primers y dNTPs sobrantes de la PCR utilizando la mezcla comercial ExoSAP: 5µl del producto de la PCR + 2µl de ExoSAP por tubo. Los tiempos y temperaturas de la reacción de limpieza son los siguientes: 15 minutos a 37°C seguidos de 15 minutos a 80°C.

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados mediante el método de Sanger fluorescente (se utilizaron ddNTPs marcados fluorescentemente para su posterior análisis por electroforesis capilar). Para ello, se usó el kit comercial de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems. La mezcla de secuenciación realizada fue la siguiente (volumen final en cada tubo: 10µl): 1,5µl de BigDye Sequencing Premix, 2,5µl de BigDye Sequencing Buffer, 1,8µl de H₂O MiliQ, 0,5µl de DMSO, 1,3µl de primers a 2,5µM (M13 *forward* si queremos secuenciar la hebra directa y M13 *reverse* si queremos secuenciar la hebra reversa) y 2,2µl del producto de PCR purificado. Tras realizar las mezclas de secuenciación, las muestras se introdujeron en un termociclador BioRad C1000 para dar inicio a la reacción de secuenciación bajo las condiciones especificadas por Applied Biosystems: desnaturalización inicial (96°C – 1min), 25 ciclos (desnaturalización: 96°C - 10s; hibridación: 50°C – 5s; extensión: 60°C – 4min), sin extensión final, reposo a 4°C. Tras la reacción de secuenciación las muestras estaban listas para ser purificadas y analizadas.

3.4. Purificación y análisis en el secuenciador

Una vez realizada la reacción de secuenciación se procedió a la purificación del producto de dicha reacción. Este paso es de suma importancia ya que se eliminan, principalmente, todos los ddNTPs fluorescentes no incorporados, dejándonos únicamente con

los fragmentos de DNA que se desean analizar. El protocolo de purificación seguido fue el siguiente:

1. Se juntan 1µl de 125mM de EDTA con 1µl de 3M de NaAc por muestra.
2. Se añaden 2µl de mezcla a cada muestra.
3. Se añaden 25µl de EtOH 100% a cada pocillo y se mezclan por inversión.
4. Se pasan las muestras a placas.
5. Se incuban 15min en oscuridad a Tª ambiente.
6. Se centrifugan las placas 30min a 3000rpm, con la centrífuga estabilizada a 4°C.
7. Se invierte la placa, se pone un papel absorbente debajo y se centrifuga hasta que llegue a 1900rpm. En ese momento se para la centrífuga.
8. Se añaden 35µl de EtOH 70% a cada pocillo.
9. Se centrifuga la placa 15min a 3000rpm y 4°C.
10. Se invierte la placa, se pone un papel absorbente debajo y se centrifuga 1min a 1900rpm. Se empieza a contar en el momento en que la centrífuga alcance las 1900rpm.
11. Se deja secar la placa secar unos 20min en oscuridad y Tª ambiente.
12. Se añaden 20µl de H2O MiliQ y se deja resuspender unos 15min.
13. Se añaden 15µl de formamida y se lleva la placa al secuenciador.

Las muestras se analizaron en un analizador genético ABI3500 de Applied Biosystems y se procesaron con el software Sequencing Analysis de la misma casa comercial.

4. RESULTADOS

Únicamente uno de los 27 pacientes analizados presentaba una variante genética previamente descrita. Dicha variante se encuentra en el exón 32 del gen *MYH7*. A continuación se detallan los resultados de los experimentos que permitieron su identificación, así como los estudios *in silico* de su posible patogenicidad.

4.1. Resultado de la amplificación por PCR

El exón 32 se amplifica conjuntamente al exón 31, generando un fragmento de 665 pares de bases. En la figura 2 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de

dicho amplificado para los 27 pacientes estudiados. Tras observar la ausencia de amplificación del control negativo, se verificó que el fragmento obtenido correspondía al tamaño esperado con la ayuda del marcador de talla. No se consiguió amplificar la muestra del paciente 22.

Todos los amplificados que no funcionaron se repitieron variando la cantidad de DNA que se añadía a cada tubo. De este modo, se aseguró la correcta amplificación y posterior secuenciación de todos los fragmentos para todos los pacientes.

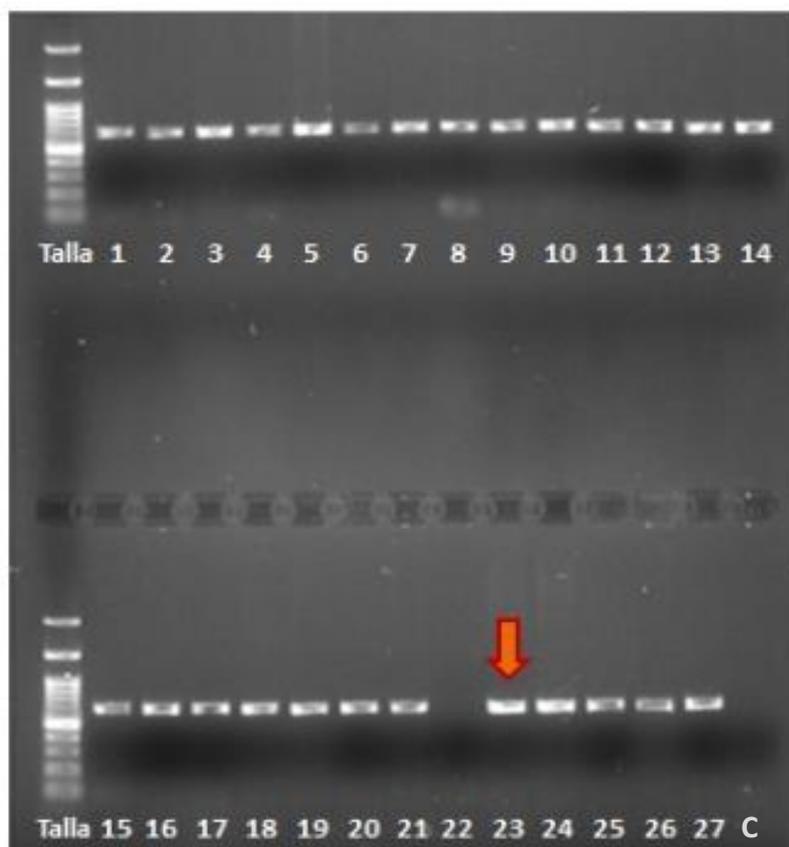


Figura 2. Resultados de la amplificación por PCR del fragmento E31+32. Gel de agarosa al 1,5% en el que se cargaron los fragmentos E31+32 (665 bases) de todos los pacientes. Los números bajo las calles indican el número de paciente. La calle C corresponde al control negativo. En las dos primeras calles de la izquierda (superior e inferior) se cargó el marcador de talla de 1Kb.

4.2. Resultado de la secuenciación

En la figura 3 se muestra el resultado de la electroforesis capilar realizada para el fragmento que contiene la mutación. El fragmento de la secuencia que contiene la mutación del paciente número 23 se comparó con una secuencia control (individuo sano).

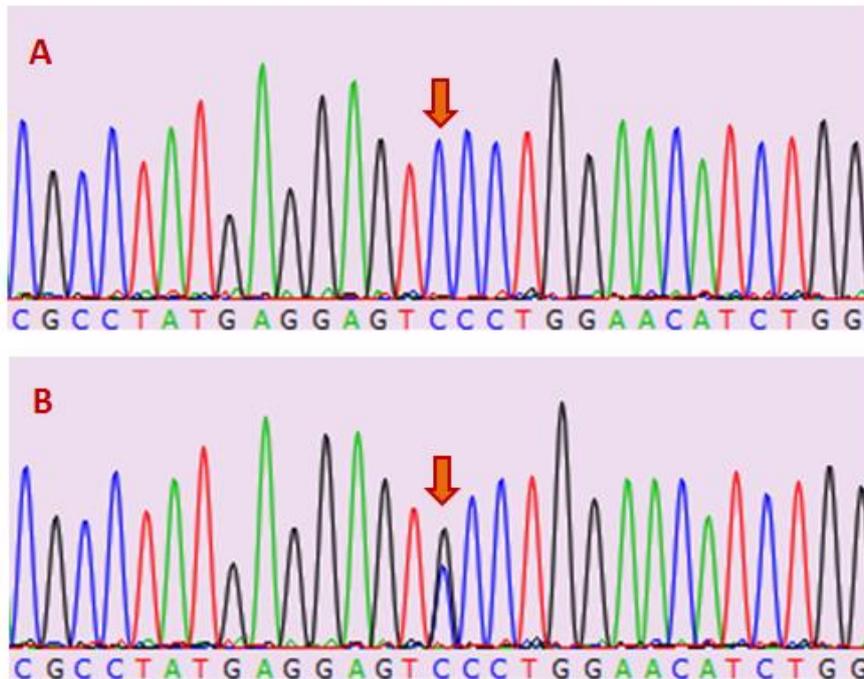


Figura 3. Resultados de la secuenciación del exón 32 del paciente número 23. A) Secuencia control. B) Resultado de la secuenciación del paciente 23. Se puede observar que el paciente 23 cuenta con un doble pico (marcado con una flecha) que no está presente en el control.

El análisis de la secuenciación reveló la presencia de una alteración en heterocigosis en el exón 32 del paciente 23. Dicha alteración consistía en la sustitución, en un alelo, de citosina por guanina. Al comparar esta secuencia con la de referencia (figura 4), puede observarse que dicho cambio está localizado en la posición 4472 del cDNA (c.4472C>G) y conlleva el cambio de la serina en posición 1491 por cisteína (p.Ser1491Cys). Dado que el aminoácido codificado por el codón 1491 cambia, podemos afirmar que el paciente 23 cuenta con una mutación *missense*. Dicha mutación se localiza en la región LMM del *rod* de la miosina.

Base:	4459	GCCTATGAGGAGT	C	CTGGAACATCTG	4485
Codón:	1486	-A--Y--E--E--	S	-L--E--H--L-	1495
			C4472>G		
			Ser1491>Cys		

Figura 4. Caracterización de la mutación. Representación esquemática del fragmento de secuencia del gen MYH7 en el que se halla la mutación, así como de la secuencia de codones. En rojo se muestra la posición de la citosina 4472 mutada.

4.3. Estudios *in silico*

La región en la que se halla la mutación (dominio LMM) no se encuentra cristalizada. Para poder realizar predicciones por homología, se ha realizado un análisis de la estructura del dominio S2 dado que el dominio S2 y el dominio LMM son estructuralmente idénticos al formar parte del *rod* de la miosina. La estructura del dominio S2 de la miosina cardiaca humana (PDB: 2FMX) se analizó con el programa de visionado de estructuras PyMOL (figura 5).

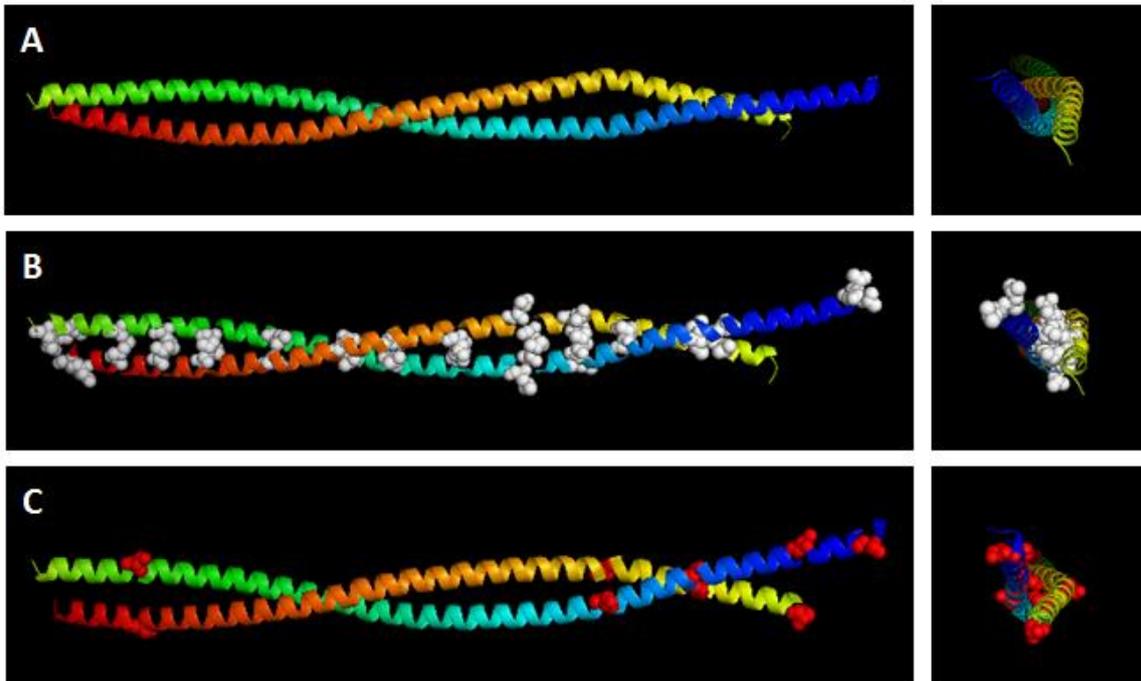


Figura 5. Estructura del dominio S2 de la miosina cardiaca humana (PDB: 2FMX). A) Representación del dominio S2 de la miosina cardiaca humana (vista lateral y frontal), se puede apreciar la doble hélice trenzada (coiled-coil). B) Distribución de las leucinas presentes en la secuencia (blanco) y que forman la cremallera que genera el núcleo hidrofóbico que mantiene estable la doble hélice trenzada (vista lateral y frontal). C) Distribución de las serinas presentes en la secuencia (rojo) que se disponen de forma simétrica ayudando a estabilizar la estructura mediante puentes salinos y de hidrógeno (vista lateral y frontal).

5. DISCUSIÓN

La mayoría de las mutaciones descritas hasta ahora para la miosina se agrupan en las regiones funcionalmente relevantes de la proteína, tales como el sitio de unión a actina en el dominio S1, el brazo palanca o *lever arm* que se encarga de hacer pivotar el dominio S1 sobre la cola (o *rod*) o el dominio S2¹²⁻¹⁴. De hecho, un estudio reveló que hasta el 80% de las mutaciones descritas para el gen *MYH7* están confinadas entre los exones 3 y 23, que codifican

para la cabeza y el cuello de la miosina (dominios S1 y S2), zonas de mayor relevancia funcional¹⁵.

Se ha demostrado la gran mayoría de las mutaciones en este gen contribuyen a disminuir la fuerza contráctil del sarcómero así como a reducir la eficiencia de la utilización de ATP por parte de la miosina¹⁶, si bien se han descrito dos mutantes de *MYH7* que incrementan la fuerza contráctil de las miofibrillas^{17,18}. Con todo esto, los miocitos responden a este déficit de fuerza contráctil con una hipertrofia compensatoria generando así la hipertrofia del músculo completo o de porciones de éste (ventrículo izquierdo en el caso de la MCH). La mutación descrita en este trabajo no pertenece a las regiones de la miosina que interactúan con la actina, el ATP o el calcio, por lo que la explicación de la disminución de la contractilidad no puede abordarse desde el punto de vista funcional.

En estos momentos, métodos combinados de predicción están ayudando a comprender el impacto que tienen las mutaciones desde el punto de vista tanto funcional como estructural y se están empezando a considerar las mutaciones en zonas estructurales (como el *rod*) como objeto de estudio. El *rod* de la miosina cuenta con una estructura doble helicoidal trenzada o *coiled-coil* que forma el filamento grueso de la miosina y, por lo tanto, no participa en el ciclo de entrecruzamiento actina-miosina que genera la fuerza de contracción en el sarcómero. Las dos α -hélices paralelas que este *coiled-coil* están formados por motivos estructurales heptaméricos repetidos (*a, b, c, d, e, f* y *g*) en los que los aminoácidos situados en las posiciones *a* y *d* (las que están orientadas al interior de la doble hélice) son hidrofóbicos (mayoritariamente leucinas) y contribuyen a formar la cremallera de interdigitaciones que genera el núcleo hidrofóbico y mantiene la estructura estable¹⁸. En estas posiciones también pueden encontrarse aminoácidos pequeños sin carga, como la serina. Además, la presencia de puentes salinos y de puentes de hidrógeno a lo largo de la estructura es de vital importancia para la correcta neutralización de grupos cargados que puedan afectar al núcleo hidrofóbico así como para la estabilización y refuerzo del *coiled-coil*.

Al igual que la mutación hallada, otras muchas mutaciones han sido descritas que afecten al *rod* de la miosina y que puedan tener un efecto desestabilizante en la estructura. Hay que destacar también que la mutación hallada, Ser1491Cys (dbSNP: rs3729823), ya ha sido descrita con anterioridad en trabajos previos sobre la HCM^{15,16,19,20}, donde únicamente se valora su implicación en la clínica de la MCH sin centrarse en realizar estudios funcionales.

Uno de los problemas a la hora de analizar estructuralmente el posible efecto de la mutación hallada es que el *rod* de la miosina no está cristalizado en su totalidad y, en concreto,

la zona en la que se encuentra la mutación, el dominio LMM, no lo está. Se ha pretendido, por lo tanto, usar la única zona del *rod* cristalizada y de la cual existe estructura caracterizada como modelo para realizar predicciones. Dicho fragmento cristalizado pertenece al dominio S2 de la miosina. La razón por la cual se ha utilizado este dominio como modelo para realizar predicciones es que tiene la misma estructura que el dominio LMM.

Para comenzar, se ha analizado el posible efecto desestabilizante que pudiera tener la mutación en la estructura. La serina 1491 se encuentra en la posición *d* del heptapéptido¹⁶ y, por lo tanto, está orientada hacia el interior del *coiled-coil*. Es sabido que las serinas son capaces de generar tanto puentes salinos como puentes de hidrógeno utilizando el grupo hidroxilo de la cadena lateral como aceptor-donador. Utilizando la estructura del fragmento S2 como modelo, cabe la posibilidad de que la serina 1491 ayude a estabilizar la estructura mediante un puente de hidrógeno con la serina en posición *d* de la hélice adyacente, ya que la estructura del *rod* de la miosina es simétrica y ambas hélices cuentan con la misma secuencia aminoacídica. Por lo tanto, podría ser que la sustitución de esta serina por una cisteína desestabilice esta unión ya que los grupos sulfhidrilo de las cisteínas son pobres donadores-aceptores de puentes de hidrógeno. Además, se daría una descompensación del entorno hidrofóbico colindante al introducir grupos polares que no pueden neutralizarse mutuamente mediante puentes de hidrógeno y que además pueden ser susceptibles a desprotonación (se sabe que los grupos -SH son grupos reductores muy potentes y sensibles al estado redox de su entorno). Como opción alternativa, es posible que la sustitución de esta serina por una cisteína propicie la aparición de un puente disulfuro anómalo que introduzca una torsión o un doblamiento inusual y anómalo del *coiled-coil* de la miosina. Como ya se ha comentado, la mutación se halla en la zona del *rod* que interacciona con los *rods* de las demás moléculas de miosina que forman el filamento grueso del sarcómero. Por lo tanto, la introducción de puentes disulfuro atípicos conllevaría la aparición de un filamento sarcomérico grueso con de estructura alterada que pudiera condicionar la contracción del sarcómero.

En definitiva, una mutación con un potencial tan grande de alterar la estructura como la hallada en el paciente 23 puede ser la causa de un mal empaquetamiento de los *rods* a lo largo del filamento grueso del sarcómero que tendría como consecuencia una disfunción de las miofibrillas del músculo cardíaco. Por tanto, el tejido muscular cardíaco respondería a esta disminución en la fuerza contráctil de los miocitos con una hipertrofia compensatoria que genera la MCH en el paciente.

6. CONCLUSIONES

Mutaciones localizadas en la región estructural del gen *MYH7*, como la descrita en este trabajo, pueden tener efectos desestabilizantes en la estructura de la miosina que pueden desencadenar la formación de filamentos sarcoméricos gruesos contráctilmente deficitarios. Por lo tanto, el análisis estructural de las mutaciones presenta una interesante área de estudio futura que puede ayudar a comprender los mecanismos de patogenicidad que contribuyen a desarrollar miocardiopatía hipertrófica.

REFERENCIAS

1. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, et al. 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;92:785-9.
2. Maron BJ, Epstein SE. Hypertrophic cardiomyopathy: a discussion of nomenclature. *Am J Cardiol*. 1979;43:1242-4.
3. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002;287:1308-20.
4. Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: clinical spectrum and treatment. *Circulation*. 1995;92:1680-92.
5. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, et al. American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1687-713.
6. Frenneaux MP, Counihan PJ, Caforio AL, et al. Abnormal blood pressure response during exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1990;82:1995-2002.
7. Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:185-216.
8. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001;104:557-67.
9. Ingles J, Doolan A, Chiu C, et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counseling. *J Med Genet*. 2005;42:e59.
10. Watkins H, Thierfelder L, Hwang DS, et al. Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. *J Clin Invest*. 1992;90:1666-71.
11. Blankenfeldt W, Thomä NH, Wray JS, Gautel M, Schlichting I. Crystal structures of human cardiac beta-myosin II S2-Delta provide insight into the functional role of the S2 subfragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(47):17713-7.
12. Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1992;326:1108-1114.
13. Rayment I, Holden HM, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3864-3868.

14. Australian National Genomic Information Service, National Health and Medical Research Council. FHC Mutation Database. Available at: www.angis.org.au/pbin/Databases/Heart/fhc. Accessed November 1, 2001.
15. Van Driest SL1, 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*. 2004;44(3):602-10
16. Blair E, Redwood C, de Jesus Oliveira M, Moolman-Smook JC, Brink P, Corfield VA, Ostman-Smith I, Watkins H. Mutations of the light meromyosin domain of the beta-myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2002;90(3):263-9.
17. Palmiter KA, Tyska MJ, Haeberle JR, Alpert NR, Fananapazir L, Warshaw DM. R403Q and L908V mutant beta-cardiac myosin from patients with familial hypertrophic cardiomyopathy exhibit enhanced mechanical performance at the single molecule level. *J Muscle Res Cell Motil*. 2000;21:609–620.
18. Tyska MJ, Hayes E, Giewat M, Seidman CE, Seidman JG, Warshaw DM. Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2000; 86:737–744.
19. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, Komajda M. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur Heart J*. 2005;26(8):794-803.
20. Hougs L, Havndrup O, Bundgaard H, Køber L, Vuust J, Larsen LA, Christiansen M, Andersen PS. One third of Danish hypertrophic cardiomyopathy patients with *MYH7* mutations have mutations in *MYH7* rod region. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(2):161-5.