

Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie: Genetik und molekulare Mechanismen

Dagmar Keller^{a,b}, Stefan Osswald^a, Marijke Brink^b

^a Kardiologische Klinik, Universitätsspital Basel

^b Departement Klinisch-Biologische Wissenschaften DKBW, Universitätsspital Basel

Finanzielle Unterstützung: Diese Arbeit wurde unterstützt durch Beiträge des Fördervereins für Kardiologie Basel, des AstraZeneca-Fonds Basel und des VFWAWF-Fonds des Universitätsspitals Basel.

Einleitung

Die molekulare Kardiologie hat in den letzten Jahren wichtige neue Einblicke in die Pathophysiologie vererbbarer kardialer Erkrankungen erlaubt. Durch die Identifizierung von in diesen Krankheiten involvierten Genen und deren Proteine ist es deutlich geworden, dass verschiedene zelluläre Komponenten in der Pathogenese beteiligt sind. In monogenen Erkrankungen wird der kranke Phänotyp durch eine Mutation in einem Gen bewirkt. Dieser Phänotyp kann jedoch durch die Komplexität des Genotypes und anderen Faktoren dramatisch beeinflusst werden. Eine der intensivst untersuchten monogenen Erkrankungen ist die familiäre Form der hypertrophen Kardiomyopathie (FHC). Die FHC ist eine myokardiale Erkrankung charakterisiert durch eine links- und/oder rechtsventrikuläre Hypertrophie, die typischerweise asymmetrisch verläuft und das interventrikuläre Septum involviert [1]. Ein typisches Merkmal der familiären hypertrophen Kardiomyopathie ist die breite Heterogenität des Phänotypes hinsichtlich Beginn der Erkrankung, Ausmass und Verteilung der Hypertrophie sowie Art und Schweregrad der klinischen Manifestationen. Die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie ist genetisch äusserst heterogen und wird deshalb als komplexe monogene Erkrankung bezeichnet. Die typische Form der familiären hypertrophen Kardiomyopathie wird bedingt durch Mutationen in 12 Genen, die alle Proteine des kardialen Sarkomeres kodieren. Die Variabilität des Phänotypes hängt einerseits von der Mutation in einem dieser Hauptgene ab, aber auch von der Komplexität des Genotypes und dem Einfluss von modifizierenden Genen. Durch Genanalysen und Studien von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen konnten Mutationen identifiziert werden, die mit einem hohen Risiko für den plötzlichen Herztod (SCD, «sudden cardiac death»), eines der klinischen Hauptprobleme der familiären hypertrophen Kardiomyopathie, assoziiert sind. Molekulargenetische Untersuchungen haben einen Einblick in die Pathogenese der familiären hypertrophen Kardiomyopathie gegeben und mögliche molekulare Mechanismen identifiziert.

Genetische Heterogenität der familiären hypertrophen Kardiomyopathie

Die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie wird in 60% der Fälle autosomal-dominant vererbt. Die Prävalenz ist 0,2% bei jungen Erwachsenen [2]. Neben diesem Vererbungsgang kann die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie sporadisch auftreten oder mit inkompletter Penetranz einhergehen. In der typischen Form der familiären hypertrophen Kardiomyopathie wurden Mutationen in 12 Genen gefunden, die alle sarkomerische Proteine der Herzmuskelzelle kodieren (Abb. 1 und 2) [3]. Vier Gene kodieren die Proteine der dicken Filamente: *MYH7* für die « β -myosin heavy chain», *MYH6* für die « α -myosin heavy chain» (β/α -MyHC), *MYL3* für die «essential myosin light chain» (MLC-1), *MYL2* für die «regulatory myosin light chain» (MLC-2); fünf Gene kodieren die dünnen Filamente: *ACTC* für das « α -cardiac actin» (α -cAct), *TNNT2*, *TNNI3* und *TNNC1* für die «cardiac troponins» T, I und C (cTnT, cTnI und cTnC) und *TPM1* für das α -Tropomyosin. *MYBPC3* kodiert das «cardiac myosin-binding protein C» (cMyBP-C), welches im Sarkomer transversal angeordnet ist und Bindungsstellen für MyHC und Titin hat. cMyBP-C hat wichtige strukturelle und funktionelle Rollen

Gen	Lokus	Protein
<i>MYH7</i>	14q11.2-q12	β -myosin heavy chain (β -MyHC)
<i>MYH6</i>	14q11.2-q12	α -myosin heavy chain (α -MyHC)
<i>MYL3</i>	3p21.2-3p21.3	essential myosin light chain (MLC-1s/v)
<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	regulatory myosin light chain (MLC-2s/v)
<i>ACTC</i>	15q14	α -cardiac actin (α -cAct)
<i>TNNT2</i>	1q3	cardiac troponin T (cTnT)
<i>TNNI3</i>	19p13.2-q13.2	cardiac troponin I (cTnI)
<i>TNNC1</i>	3p21.3	cardiac troponin C (cTnC)
<i>TPM1</i>	15q22	α -Tropomyosin (α -TM)
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	cardiac myosin-binding protein C (cMyBP-C)
<i>TITN</i>	2q35	Titin
<i>CRP3</i>	11p15.1	muscle LIM protein (MLP)

Abbildung 1.

Lokus Heterogenität der familiären hypertrophen Kardiomyopathie. Die reine Form der familiären hypertrophen Kardiomyopathie wird bedingt durch Mutationen in 12 Genen, die alle sarkomerische Proteine kodieren.

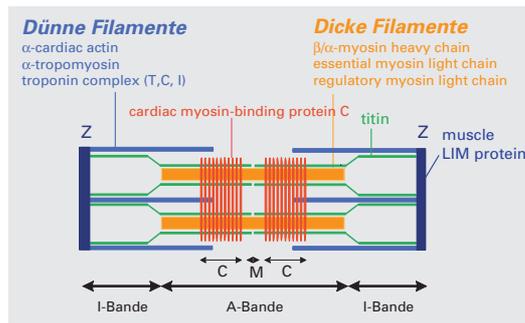


Abbildung 2. Lokalisation der FHC-Proteine im Sarkomer. Das Sarkomer wird an beiden Enden durch die Z-Linie begrenzt, an der die dünnen Filamente verankert sind. Die zentrale A-Bande wird durch die Proteine der dicken Filamente gebildet. Das cMyBP-C bildet die C-Zonen der A-Bande. Titin, das dritte Filamentprotein, ist ebenfalls an der Z-Linie verankert. Das «muscle LIM protein» hat eine stabilisierende Funktion des kontraktilen Apparates (adaptiert aus [3]).

während der kardialen Kontraktion. *TTN* kodiert Titin, das dritte Filamentprotein und *CRP3* das «muscle LIM protein» (MLP), welches ein Protein der Z-Zone ist und den kontraktilen Apparat stabilisiert. Kürzlich wurde eine FHC-assoziierte Mutation in der Promotorregion des Phospholamban Gens (*PLN*) beschrieben [4].

Neben der reinen Form wurden FHC-Familien beschrieben, die zusätzlich ein Wolff-Parkinson-White-Syndrom mit ventrikulärer Präexzitation aufwiesen. Bei diesem kombinierten Phänotyp von Kardiomyopathie und Arrhythmie wurden Mutationen im *PRKAG2*-Gen identifiziert, welches die « γ_2 -regulatory subunit» der «AMP-activated protein kinase» (AMPK) kodiert. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen pathologischen Strukturproteinen ist AMPK ein metabolisches Protein.

Heute sind ca. 200 Mutationen in all diesen Genen bekannt. Systematisches Screening dieser Gene in einem grossen Kollektiv von FHC-Familien hat gezeigt, dass ca. 80% der genotypisierten Familien eine Mutation im *MYH7*- oder *MYBPC3*-Gen aufweisen (Tab. 1) [5]. Diese beiden Gene werden bei einer genetischen Analyse zuerst untersucht. Da viele Familien eine

eigene Mutation tragen, werden nicht nur die bekannten Mutationen gescreent, sondern vielmehr das ganze Gen auf Mutationen untersucht.

Molekulare Mechanismen

Bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie werden zwei Haupttypen von Mutationen gefunden: die häufiger vorkommenden Missense-Mutationen, die hauptsächlich im *MYH7*-Gen vorkommen, und Frameshift-Mutationen, die häufig im *MYBPC3*-Gen gefunden werden. Verschiedene genetisch-modifizierte Modelle erlauben es, die in der familiären hypertrophen Kardiomyopathie involvierten molekulare Mechanismen zu studieren. *Ex-vivo*-Analysen zellulärer Modelle dienen zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen auf die sarkomerische Struktur und Kontraktilität. So wurde anhand von Gentransfer in verschiedene zelluläre Modelle gezeigt, dass aus Missense-Mutationen resultierende sarkomerische Proteine stabil sind und in die sarkomerische Struktur eingebaut werden [6]. Die mutierten Proteine konnten auch in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit heterozygoten Mutationen im *MYH7*- oder *TPM1*-Gen nachgewiesen werden [7, 8]. Solche Missense-Mutationen wirken als «poison-polypeptide» und führen zur Ausbildung der Hypertrophie durch einen dominant-negativen Effekt auf die Struktur und/oder Funktion des Sarkomers. Im Gegensatz dazu sind die meisten Mutationen, die im *MYBPC3*-Gen gefunden werden, Frameshift-Mutationen. Dieser Mutations-typ führt zur Trunkierung des Proteins, welches nur schwach in den Kardiomyozyten angereichert wird, was in einem Modell mit fetalen Rattenkardiomyozyten gezeigt werden konnte [9]. In Myokardgewebe von Patienten, die Träger einer Frameshift-Mutation sind, konnte das mutierte Protein nicht nachgewiesen werden [10, 11]. Aufgrund dieser Daten wird angenommen, dass Frameshift-Mutationen als Null-Allele wirken und zur Haploinsuffizienz führen.

In einem mittels Gene-targeting-Technik hergestellten «knock-out»-Mausmodell des cMyBP-C konnte diese Hypothese erläutert werden [12]. Solche Tiermodelle erlauben *In-vivo*-Analysen und die komplettesten Studien menschlicher Pathologien. Die aus diesem Modell resultierenden heterozygoten cMyBP-C-Mäuse, die nur ein funktionelles Allele tragen, zeigen eine asymmetrische Septumhypertrophie und eine myokardiale Desorganisation, wie sie in der humanen FHC gefunden wird.

Unklar bleibt, warum diese verschiedenen Mutationstypen – Missense und Frameshift – zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie führen. Eine Schlüsselrolle scheint der Energiemetabolismus als Trigger für die Hypertrophie zu haben. In Patienten, die Träger einer Mutation

Tabelle 1: Verteilung der Mutationen in FHC-Genen: prozentuale Verteilung der mutierten Gene in 124 FHC-Indexpatienten (inkl. 15 sporadische Fälle) [5]. Es wurden 9 der 12 FHC-Genen systematisch gescreent, wobei sich zu je 42 resp. 40% Mutationen in den Hauptgenen *MYBPC3* und *MYH7* und deutlich weniger bis selten Mutationen in den Genen *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2* und *MYL3* fanden. In dieser Studienpopulation wurden keine Mutationen in den *TPM1*-, *TNNC1*- und *ACTC*-Genen gefunden.

Gen	Verteilung in %
<i>MYBPC3</i>	42
<i>MYH7</i>	40
<i>TNNT2</i>	6.5
<i>TNNI3</i>	6.5
<i>MYL2</i>	4
<i>MYL3</i>	<1

im *MYH7*-, *MYBPC3*- oder *TNNT2*-Gen sind, konnte eine Verminderung des Energiemetabolismus nachgewiesen werden. Interessanterweise war diese Verminderung unabhängig vom Ausmass der linksventrikulären Hypertrophie [13]. Kürzlich haben wir in einer *In-vitro*-Analyse eine mögliche Relation zwischen Mutation und Energiedepletion gezeigt: Eine *MYH7*-Mutation in homozygoten Zustand führte zu einem disproportionalen Anstieg der mechanischen und enzymatischen Eigenschaften des mutierten Proteins, was für einen ineffektiven ATP-Verbrauch spricht und eine Energiedepletion als möglichen Trigger für die Ausbildung der Hypertrophie suggeriert [14].

Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Der FHC-Phänotyp ist nicht schematisierbar, sondern variiert vielmehr inter- und sogar intrafamiliär in Abhängigkeit der Mutation in einem Hauptgen, dem Einfluss von Polymorphismen in modifizierenden Genen und auch Umweltfaktoren. Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudien in grossen, nicht verwandten Familien haben Einblick über den mit einem mutierten Gen oder einer spezifischen Mutation assoziierten Phänotyp gegeben.

Generell sind Mutationen im *MYH7*-Gen mit einem frühen Beginn der linksventrikulären Hypertrophie vergesellschaftet. Spezielle Mutationen im *MYH7*-Gen sind mit einem hohen SCD-Risiko vergesellschaftet: Arg403Gln, Arg719Trp, Arg453Cy und Arg723Gly. Im Gegensatz dazu haben die Mutationen Gly256Glu, Val606Met und Leu908Val eine gute Prognose hinsichtlich dem Auftreten rhythmusbedingter Ereignisse [15]. Mutationen in *MYBPC3* sind oft mit einem späten Beginn der Hypertrophie und guter Prognose vereinbar [16]. Die Besonderheit von *TNNT2*-Mutationen ist die meistens minimale linksventrikuläre Hypertrophie, die jedoch mit einem hohen SCD-Risiko einhergeht [17]. In Genen, in welchen prozentual wenig Mutationen gefunden werden, basieren Genotyp-Phänotyp-Korrelationen auf Daten einzelner Familien. So wurden in den *TNNT1*- und *TPM1*-Genen in einzelnen Familien Mutationen gefunden, die mit variablen Phänotypen, aber auch mit dem SCD assoziiert waren [18, 19]. Mutationen in *ACTC* folgen keinem spezifischen Genotyp-Phänotyp-Schema [20].

Studien von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen in den *MYBPC3*- und *TNNT2*-Genen haben zwei wichtige Aspekte der familiären hypertrophen Kardiomyopathie gezeigt: Die inkomplette Penetranz, bei der nicht alle Träger eines kranken Allels den Phänotyp ausbilden, und die Variabilität der Expressivität mit verschiedenen phänotypischen Manifestationen innerhalb Träger des gleichen genetischen Defekts. Diese Variabilität

der Expressivität kann zum Teil durch den Einfluss von Polymorphismen in modifizierenden Genen erklärt werden, die für ACE, Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor und Endothelin kodieren [21]. Kompliziert wird die Definition des FHC-Phänotypes durch einen weiteren Aspekt: die Komplexität des Genotyps. Etwa 5% aller Familien weisen homozygote Mutationen, doppelt heterozygote Mutationen mit je einer Mutation in zwei verschiedenen Genen und kombiniert heterozygote Mutationen mit zwei Mutationen auf demselben Gen auf. Die aus diesen komplexen Genotypen resultierenden Phänotypen sind meistens schwerwiegender als die aus heterozygoten Mutationen resultierenden. So sind homozygote Mutationen in *MYH7* und *MYBPC3* mit «sudden cardiac death» in frühem Alter, Herzinsuffizienz und Vorhofsarrhythmien assoziiert [5, 14].

Technik des genetischen Tests

Um einen genetischen Test durchzuführen, braucht es 10 ml EDTA-Blut. Die DNA wird aus den peripheren Lymphozyten extrahiert. Genmutationen können entdeckt werden nach Amplifizierung aller kodierenden Exone des Genes mittels «polymerase chain reaction» (PCR), gefolgt von einer Screeningmethode wie «single strand conformational polymorphism» (SSCP) oder «denaturing high performance liquid chromatography» (DHPLC) und schliesslich Sequenzierung. Diese Methoden sind hoch spezifisch, wenn die PCR primer das gesamte Exon und wichtige intronische Anteile umfassen und die Analysen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. In naher Zukunft werden Gen-Chips zum Screening aller in der familiären hypertrophen Kardiomyopathie involvierten Genen entwickelt werden und die Analysen rationalisieren.

Genetische Beratung

Die Komplexität der breiten phänotypischen Heterogenität im Kontext einer komplexen Genetik verlangt nach einem multidisziplinären und mehrzeitigen Ansatz mit der Involvierung von Kardiologen, Genetikern und anderen Spezialisten wie z.B. Psychologen [22]. Die genetische Beratung dient zur generellen Information über die Erkrankung und spezifisch für die Beratung von betroffenen Individuen sowie prädiktiv für phänotypisch gesunde Familienmitglieder. Die genetische Abklärung von erstgradig verwandten Familienmitgliedern eines betroffenen Individuums ist anzustreben. Wenn ein Gentest nicht möglich ist, werden wiederholte klinische und nicht invasive Untersuchungen zur FHC-Diagnostik empfohlen.

Konklusion

Die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie ist eine genotypisch und phänotypisch heterogene Erkrankung. Die sorgfältige Evaluation des Phänotypes und genetische Analysen sind wichtig für das optimale Patientenmanagement. Eine gefürchtete Komplikation ist der «sudden cardiac death». ESC/ACC-Guidelines helfen zur Abschätzung des SCD-Risikos. Die Genanalyse ist ein zusätzlicher Test zur Risikostratifizierung.

Weiterführende Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudien und die Analyse klinischer Daten in informativen FHC-Familien sind wichtig und werden in Zukunft erlauben, FHC-Patienten mit hohem Risiko besser zu identifizieren.

Kontaktadressen für Genanalysen in der Schweiz:
Basel: Dr. Dagmar Keller, Universitätsspital Basel,
Lausanne: Dr. Xavier Jeanrenaud, CHUV Lausanne,
Genf: Dr. Siv Fokstuen, HUG Genf

Literatur

- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maish B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organisation/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841–2.
- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 1995;92:785–9.
- Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 1998;83:580–93.
- Minamisawa S, Sato Y, Tatsuguchi Y, Fujino T, Imamura S, Uetsuka Y, et al. Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:1–4.
- Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227–32.
- Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002;82:945–80.
- Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, Seller JR, Epstein NE. Skeletal muscle expression and abnormal function of β -myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1993;91:2861–5.
- Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, Pellegrino MA, Maron BJ, Spirito P, et al. A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res* 1998;82:106–15.
- Flavigny J, Souchet M, Sébillon P, Berrebi-Bertrand I, Hainque B, Mallet A, et al. COOH-terminal truncated cardiac myosin-binding protein C mutants resulting from familial hypertrophic cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation in fetal rat cardiomyocytes. *J Mol Biol* 1999;294:443–56.
- Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, Labeit S, Franz WM, Fischer C, et al. Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest* 1997;100:475–82.
- Moolman JA, Reith S, Uhl K, Bailey S, Gautel M, Jeschke B, et al. A newly created splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation* 2000;101:1396–1402.
- Carrier L, Knöll R, Vignier N, Keller DI, Bausero P, Prudhon B, et al. Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovasc Res* 2004;63:293–304.
- Crilly JG, Boehm EA, Blair E, Rajagopalan B, Blamire AM, Styles P, et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1776–82.
- Keller DI, Coirault C, Rau T, Cheav T, Weyand M, Amann K, et al. Human homozygous R403W mutant cardiac myosin presents disproportionate enhancement of mechanical and enzymatic properties. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:355–62.
- Marian AJ, Roberts R. Molecular genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: genetic markers for sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:88–99.
- Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to cardiac myosin binding protein C gene. *Circulation* 1998;97:2230–6.
- Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman CE, Brink PA, et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:549–55.
- Kokado H, Shimizu M, Yoshio H, Ino H, Okeie K, Emoto Y, et al. Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by a Lys183 deletion mutation in the cardiac troponin I gene. *Circulation* 2000;102:663–9.
- Jongbloed RJ, Marcelis CL, Doevendans PA, Schmeitz-Mulkens JM, Van Dockum WG, Geraedts JP, et al. Variable clinical manifestation of a novel missense mutation in the alpha-tropomyosin (TPM1) gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:981–6.
- Mogensen J, Perrot A, Andersen PS, Havndrup O, Klausen IC, Christiansen M, et al. Clinical and genetic characteristics of alpha cardiac actin gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet* 2004;41:e10.
- Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:242–52.
- Charron P, Heron D, Gargiulo M, Richard P, Dubourg O, Desnos M, et al. Genetic testing and genetic counselling in hypertrophic cardiomyopathy: the French experience. *J Med Genet* 2002;39:741–6.

Korrespondenz:
Dr. med. Dagmar Keller
Kardiologische Klinik
Universitätsspital Basel
Petersgraben 4
CH-4031 Basel
kellerd@uhbs.ch