

# Mutaciones en el fosfolamban en pacientes con miocardiopatía hipertrófica y miocardiopatía dilatada idiopática

## *Mutations in phospholamban in patients with hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy*

Montserrat Iglesias MD, L., Medín Santos BS, M.\*, Hermida Prieto Phd, M.\*, Fernández Fernández MD, X., Laredo Vázquez BS, R.\*, Rodríguez García BS, I.\*, Cazón Varela BS, L.\*, Penas Lado MD, M., Castro Beiras MD, A.

Servicio de Cardiología. CHU Juan Canalejo.

\* Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña.

### RESUMEN

**Antecedentes:** La miocardiopatía hipertrófica (MCH) y la miocardiopatía dilatada idiopática (MCD) son enfermedades primarias del músculo cardíaco de presentación familiar. Recientemente se han descrito mutaciones en el gen PLN, que codifica la proteína fosfolamban en dos familias con MCD y en un paciente con MCH. El objetivo de este estudio es conocer la frecuencia de mutaciones en el gen PLN en nuestra población de pacientes con MCH y MCD.

**Métodos:** Se realizó screening mutacional mediante SSCP del gen PLN en 105 pacientes con MCH y en 81 pacientes MCD controlados en nuestra consulta de miocardiopatías. Se secuenciaron aquellas muestras con movilidad electroforética anormal.

**Resultados:** Se identificó una mutación en la región promotora de PLN (-42 C>G) en una paciente con MCH apical de desarrollo tardío y en dos hijos, uno con MCH apical con hipertrofia ligera y otro aparentemente sano.

**Conclusión:** Las mutaciones en el gen PLN no son causa frecuente de MCH o MCD en nuestra población. La mutación PLN -42C>G podría estar asociada con el desarrollo de MCH apical. Son necesarios un seguimiento prolongado de los portadores y estudios funcionales sobre el efecto de esta mutación en la expresión proteica para aclarar su papel patogénico.

**Palabras clave:** Miocardiopatía dilatada, Miocardiopatía hipertrófica, PLN.

Mutaciones en el fosfolamban en pacientes con miocardiopatía hipertrófica y miocardiopatía dilatada idiopática

Monserrat Iglesias L, Medín Santos M, Hermida Prieto M, Fernández Fernández X, Laredo Vázquez R, Rodríguez García I, Cazón Varela L, Penas Lado M, Castro Beiras A  
*Investigación Cardiovascular*, 2005; 8: 125-134

### ABSTRACT

**Background:** Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) are primary cardiac muscle diseases, usually with a familial presentation. Recently, mutations in the PLN gene, encoding for phospholamban protein, have been described in two families with DCM and in one HCM patient. The present study examines the frequency of PLN gene mutations in our population of patients with HCM and DCM.

**Methods:** Mutational screening of the PLN gene by Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) was performed in 105 patients with HCM and in 81 patients with DCM subjected to follow-up in our cardiomyopathy clinic. Samples with abnormal electrophoretic motility were sequenced.

**Results:** We identified one mutation in the promoter region of the PLN gene (-42 C>G) in a woman with late onset apical hypertrophic cardiomyopathy. The mutation was also found in two of her sons - one presenting apical HCM with mild hypertrophy, and the other without apparent disease manifestations.

**Conclusion:** PLN gene mutations are not a frequent cause of HCM or DCM in our population. The PLN -42C>G mutation could be associated with the development of apical HCM. Long-term follow-up of the carriers and functional studies of the effect of this mutation in protein expression are necessary to clarify its pathogenic relevance.

**Key words:** Dilated cardiomyopathy. Hypertrophic cardiomyopathy. PLN.

Mutations in phospholamban in patients with hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy

Monserrat Iglesias L, Medín Santos M, Hermida Prieto M, Fernández Fernández X, Laredo Vázquez R, Rodríguez García I, Cazón Varela L, Penas Lado M, Castro Beiras A  
*Investigación Cardiovascular*, 2005; 8: 125-134

### Correspondencia / correspondence:

Lorenzo Monserrat Iglesias  
Servicio de Cardiología. CHU Juan Canalejo  
As Xubias 84. 15006. A Coruña.  
e-mail: lorenzo\_monserrat@canalejo.org

## INTRODUCCIÓN

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) y la miocardiopatía dilatada idiopática son enfermedades primarias del músculo cardíaco (1). La MCH se caracteriza fundamentalmente por la presencia de hipertrofia miocárdica sin causa aparente. Es una enfermedad de presentación clínica y morfológica muy variable. En la mayoría de los pacientes el curso clínico es benigno, pero la MCH es una de las causas más frecuentes de muerte súbita en jóvenes y deportistas (2-4). La MCD se caracteriza por la presencia de dilatación ventricular, disfunción sistólica y diastólica, síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva y muerte prematura por fallo cardíaco o arritmias (1). Ambas enfermedades son de presentación familiar y se han descrito mutaciones en diversos genes como causa de estas enfermedades, incluyendo genes que codifican proteínas del sarcómero, el citoesqueleto y proteínas mitocondriales (2,3,5-8). Sin embargo, en un número importante de casos el estudio sistemático de los genes descritos no identifica mutaciones responsables de la enfermedad (9). Esto nos lleva a la búsqueda de nuevos genes candidatos potencialmente implicados en el desarrollo de estas miocardiopatías.

Recientemente se han descrito tres mutaciones en el gen PLN, que codifica la proteína fosfolamban, asociadas al desarrollo de miocardiopatías primarias, dos en familias con MCD y una en un paciente con MCH (10-12). El fosfolamban es una proteína que regula la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico que ocurre durante la diástole inhibiendo la actividad de SERCA2a (13). El objetivo de este estudio es conocer la frecuencia de mutaciones en el gen PLN en una población amplia de pacientes con MCH y MCD en nuestro medio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Población de estudio

Se incluyeron en el estudio 186 pacientes consecutivos controlados en una consulta especializada en miocardiopatías primarias del CHU Juan Canalejo: 105 con MCH y 81 con MCD. El diagnóstico se realizó de acuerdo con los crite-

## INTRODUCTION

*Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) are primary cardiac muscle diseases (1). HCM is fundamentally characterized by the presence of myocardial hypertrophy without an apparent underlying cause. Its clinical and morphological presentation is highly variable. In most cases the clinical course is benign, though HCM is one of the most frequent causes of sudden death among young individuals and athletes (2-4). DCM in turn is characterized by the presence of ventricular dilatation, systolic and diastolic dysfunction, symptoms of congestive heart failure and premature death due to heart failure or arrhythmias (1). Both diseases have a familial presentation, and mutations of several genes have been reported as a cause of these disorders – including genes that encode for sarcomeric and cytoskeletal proteins, and mitochondrial proteins (2,3,5-8). However, in an important number of cases, systematic study of these genes reveals no mutations capable of accounting for the disease (9). This has led to the search for new candidate genes potentially implicated in the development of these cardiomyopathies.*

*Recently, three mutations have been described of the PLN gene, which encodes for the protein phospholamban, and which have been associated with the development of primary cardiomyopathies – two in families with DCM and one in a patient with HCM (10-12). Phospholamban is a protein that regulates calcium reuptake by the sarcoplasmic reticulum during systole, inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a) activity (13). The present study examines the frequency of PLN gene mutations in a large population of patients with HCM and DCM in our setting.*

## MATERIAL AND METHODS

### Study population

*The study comprised 186 consecutive patients subjected to follow-up in a clinic specialized in primary cardiomyopathies of CHU Juan Canalejo (A Coruña, Spain): 105*

rios de la OMS y el grupo de trabajo de enfermedad miocárdica y pericárdica de la Sociedad Europea de Cardiología (1,14). Todos los pacientes dieron consentimiento informado para el estudio que fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.

En todos los pacientes se recogieron una historia clínica detallada, exploración física, electrocardiograma, ecocardiograma, análisis de sangre y el análisis genético. Como grupo control se utilizó una población de 100 individuos sanos, no emparentados entre si en la que se estudió la frecuencia poblacional de los cambios nucleotídicos encontrados.

### Análisis genético

Se estudiaron los cambios de secuencia del gen PLN con respecto a las secuencias de referencia (GenBank AF177763 y AF177764). Se extrajo ADN a partir de sangre periférica utilizando el GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Se realizaron PCRs de dos regiones diferentes, una para amplificar el promotor y el exón 1 de PLN y otra para amplificar el exón 2 de PLN. Los primers para estas PCRs se indican en la tabla I. Los productos de PCR se usaron para detectar cambios de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida mediante SSCP (Single Strand Conformational Polimorphism) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GeneGel SSCP Starter Kit, Amersham Pharmacia Biotech). Se estudiaron los patrones de movilidad electroforética a pH 8,9 y pH 9, a temperaturas de 12 y 20 °C. Los geles de SSCP se revelaron mediante tinción manual con plata. Las muestras que presentaron patrón electroforético anómalo se sometie-

with HCM and 81 with DCM. The diagnosis was based on the criteria of the World Health Organization (WHO) and the work group in myocardial and pericardial disease of the European Society of Cardiology (1,14). All patients gave informed consent to participation in the study, which was approved by the local Clinical Research Ethics Committee.

A detailed medical history was compiled in all cases, and physical, electrocardiographic and echocardiographic evaluations were made, together with blood tests and genetic analyses of all patients. One hundred unrelated healthy individuals were used as controls for studying the population frequency of the nucleotide modifications found.

### Genetic analysis

Studies were made of the changes in the sequence of the PLN gene with respect to the reference sequences (GenBank AF177763 and AF177764). DNA was extracted from peripheral blood using the GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out of two different regions – one to amplify the promoter and exon 1 of PLN, and the other to amplify exon 2 of PLN. The primers for these PCRs are reported in Table I. The PCR products were in turn used to detect changes in electrophoretic motility in polyacrylamide gels via SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) according to the instructions of the manufacturer (GeneGel SSCP Starter Kit, Amersham Pharmacia Biotech). The electrophoretic motility patterns were examined at pH 8.9 and pH 9, at temperatures

**TABLA I. Primers SSCP**  
**TABLE I. Primers - SSCP**

Región PLN	Primer Forward / Forward Primer	Primer Reverse / Reverse Primer	PLN Region
Exon 2A	5'GGCTGCCAGCTTTTATCTTTC 3'	5'ACGTGCTTGTTGAGGCATTTTC 3'	Exon 2A
Exon 2B	5'GAAATGCCTCAACAAGCACGT 3'	5'ACTCAGGAAGTGGTCTGTTATAC 3'	Exon 2B
Promotor	5'CTCTAAGCCTGAAGATGCATG3'	5'GTTTTCTGACTCTGTACCCAG 3'	Promoter

Secuencias de los primers diseñados para los productos de PCR de los fragmentos de PLN analizados mediante SSCP.  
Sequences of the primers designed for the PCR products of the PLN gene fragments analyzed by SSCP.

ron a secuenciación para comprobar la existencia de posibles cambios en relación a las secuencias de referencia (GenBank: AF177763 y AF177764). Se obtuvieron productos de PCR utilizando primers ya descritos en la bibliografía (10,12). Los productos amplificados se purificaron con el método enzimático EXOSAP-it (Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase), de USB corporation y se secuenciaron directamente con CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit usando el modelo CEQ 8000 Genetic Análisis System (Beckman Coulter). Los cambios encontrados mediante secuenciación automática en la región promotora de PLN fueron confirmados mediante ensayo ARMS (Amplified Refractory Mutation System). Esta técnica se basa en la capacidad de discriminar cambios en una secuencia mediante el diseño de PCR con primers alelo-específicos. Se diseñaron parejas de primers alelo específicos para cada uno de los cambios encontrados en la región promotora de PLN (tablas II y III)(15). Con una de las parejas de primers se consigue amplificar la cadena de DNA de fenotipo salvaje y, con la otra pareja, la cadena portadora del cambio nucleotídico. Así, en aquellos individuos heterocigotos para un cambio puntual en la secuencia nucleotídica se obtendrán bandas de PCR de los alelos mutante y salvaje, mientras que en los indivi-

of 12 and 20°C. The SSCP gels were developed via manual silver staining. The samples presenting an abnormal electrophoretic pattern were sequenced to determine the possible existence of changes in relation to the reference sequences (GenBank: AF177763 and AF177764). PCR products were obtained using primers already described in the literature (10,12). The amplified products were purified by the EXOSAP-it (Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase) enzymatic method (USB Corp.), and were directly sequenced using the CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit employing the CEQ 8000 Genetic Analysis System model (Beckman Coulter). The changes found by automatic sequencing in the promoter region of PLN were confirmed via ARMS (Amplified Refractory Mutation System) testing. This technique is based on the capacity to discriminate changes in sequence via PCR designed with allele-specific primers. Pairs of allele-specific primers were designed for each of the changes found in the promoter region of PLN (Tables II and III)(15). One of the primer pairs allows amplification of the DNA chain of the wild phenotype, while the other amplifies the chain carrying the nucleotide modification. Thus, in those individuals who are

**TABLA II. Primers Arms.**  
**TABLE II. Primers - Arms.**

Primers	Cambio -42 C >G / Change -42 C >G	Primers
Común	5' GCTTTCCACCACCTCAAGTTTAC 3'	Common
Normal	5' CAGTAGGTGGAGGAGAAAAAGTGTTCTAGAG 3'	Normal
Mutante	5' CAGTAGGTGGAGGAGAAAAAGTGTTCTAGAC 3'	Mutant
Control A	5' CCCACCTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG 3'	Control A
Control B	5' GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG 3'	Control B

Secuencias de los primers utilizados en la PCR alelo-específica para la confirmación del cambio PLN -42 C>G en la secuencia del paciente con MCH.  
El primer común es el utilizado para amplificar los alelos salvaje y mutante del promotor de PLN.  
Los primers Normal y Mutante son , respectivamente, los específicos para amplificar las secuencias salvaje y mutante, que difieren en una sola base.  
Los primers A y B son primers para la amplificación del gen constitutivo ATT que se utilizan como control de la PCR.  
*Sequences of the primers used in allele-specific PCR for confirmation of the change PLN -42 C>G in the sequence of the patient with HCM.*  
*The common primer is that used for amplifying the wild and mutant alleles of the PLN promoter.*  
*The normal and mutant primers are respectively the specific primers for amplifying the wild and mutant sequences, which differ by a single base.*  
*Primers A and B are the primers used for amplification of the constitutive gene ATT employed as PCR control.*



**TABLA III. Primers arms.**  
**TABLE III. Primers - Arms.**

Primers	Cambio -36 A>C / Change -36 A>C	Primers
Común	5' GCTTCCACACCTCAAGTTTAC 3'	Common
Normal	5' GGGAACAGTTGCAGTAGGTGGAGGAGAAAAAGTGAT 3'	Normal
Mutante	5' GGGAACAGTTGCAGTAGGTGGAGGAGAAAAAGTGAG 3'	Mutant
Control A	5' CCCACCTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG 3'	Control A
Control B	5' GGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG 3'	Control B

Las secuencias de los primers que figuran en esta tabla son las específicas para el diseño de la PCR alelo –específica para el cambio -36 A>C en el promotor de PLN. Los primers común, normal y los de control son comunes a los del ARMS diseñado para la el cambio PLN -42 C>G.

*The sequences of the primers in this table are the specific primers for designing the allele-specific PCR for change -36 A>C in the PLN promoter. The common, normal and control primers are common to those of the ARMS test designed for the PLN change -42 C>G.*

duos sanos aparecerá únicamente la banda de PCR correspondiente al alelo salvaje.

Se testó la presencia de los alelos mutantes en 100 individuos control (200 cromosomas).

## RESULTADOS

En los 186 individuos del presente estudio no se encontró ningún cambio en las secuencias del exón 1 (5'UTR) ni en el exón 2 codificante; pero se encontraron dos cambios en la región promotora de PLN. Los cambios de secuencia identificados son PLN -36 A>C y PLN -42 C>G, en dos pacientes, afectados con MCD y MCH apical respectivamente (figura 1). Ambos se confirmaron mediante ensayos ARMS.

Los dos cambios encontrados se encuentran en puntos conservados en la evolución. Los nucleótidos en posición -36 y -42 son idénticos en cuatro de las especies de mamíferos en las que se ha descrito el gen PLN (16). La transversión -36 A>C se encontró en el 5% de los individuos control. Se trata, por tanto, de un polimorfismo en ese punto de la secuencia del promotor de PLN, ya que supera el 1% poblacional establecido para definir un cambio de secuencia como mutación (17). La transversión -42 C>G no se encontró en ninguno de los 100 individuos control testados. Se trata, por tanto, de una mutación puntual en la región promotora de PLN.

*heterozygous for a point change in the nucleotide sequence we obtain PCR bands of the mutant and wild alleles, while in healthy individuals only the PCR band corresponding to the wild allele is obtained.*

*The presence of mutant alleles was tested in 100 controls (200 chromosomes).*

## RESULTS

*None of the 186 individuals included in the study showed changes in the sequences of exon 1 (5'UTR) or encoding exon 2, though two changes were found in the promoter region of the PLN gene. The identified changes in sequence were PLN -36 A>C and PLN -42 C>G, in two patients with DCM and apical HCM, respectively (Figure 1). Both were confirmed by ARMS testing.*

*The two changes found are located at evolutionarily preserved points. The nucleotides in positions -36 and -42 are identical in four of the mammalian species in which the PLN gene has been described (16). Transversion -36 A>C was found in 5% of the control individuals. The situation therefore corresponds to polymorphism at this point in the PLN promoter sequence, since its presence exceeds the 1% population rate that defines a sequence change as corresponding to mutation (17). Transversion -42 C>G was not found in any of the 100 controls. It therefore represents a point mutation in the promoter region of the PLN gene.*

**Figura 1. Mutación PLN - 42 C>G**

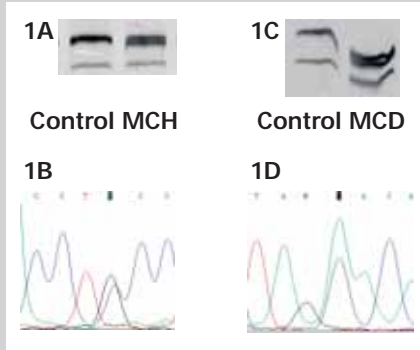
**1.a** Fotografía del gel de SSCP en donde se detecta el cambio de movilidad electroforética en el fragmento amplificado correspondiente al promotor de PLN. El individuo MCH presenta un patrón de bandas a pH 8,3 y Tª 12°C, diferente al del individuo control situado a su izquierda.

**1.b** Fluorograma de la secuencia del paciente MCH.

Se aprecia la ambigüedad S que indica la existencia de un heterocigoto (C/G) en el punto -42 de la región promotora de PLN. El cambio se presenta solamente en el individuo afectado con MCH, se trata de una mutación.

**1.c** Fotografía del gel de SSCP en donde se detecta el cambio de movilidad electroforética en el promotor de PLN. El individuo MCD presenta un patrón de bandas a pH 9,0 y Tª 12°C, diferente al del individuo control situado a su izquierda.

**1.d** Fluorograma de la secuencia del paciente MCD. Se observa la ambigüedad M (heterocigoto A/C) en el punto -36 de la región promotora de PLN. Se trata de un polimorfismo presente en el 5% de la población.



**Figure 1. PLN mutation - 42 C>G**

**1.a** SSCP gel image showing the change in electrophoretic motility in the amplified fragment corresponding to the PLN promoter. The individual with HCM presents a band pattern at pH 8.3 and a temperature of 12°C different from that of the control subject at left.

**1.b** Fluorogram of the sequence of the patient with HCM.

Note the ambiguity S that indicates the existence of a heterozygote (C/G) at point -42 of the PLN promoter region. The change is only found in the individual with HCM, and corresponds to a mutation.

**1.c** SSCP gel image showing the change in electrophoretic motility in the PLN promoter. The individual with DCM presents a band pattern at pH 9.0 and a temperature of 12°C different from that of the control subject at left.

**1.d** Fluorogram of the sequence of the patient with DCM.

Note the ambiguity M (heterozygote A/C) at point -36 of the PLN promoter region. This corresponds to polymorphism present in 5% of the population.

El caso índice portador de la mutación PLN - 42 C>G es una mujer de 85 años con MCH apical con grosor máximo de la pared de 22 mm en el ápex y grosor normal en los segmentos basales. Controlada en consultas de cardiología desde los 59 años por episodios de palpitaciones y dolor torácico con arterias coronarias normales, desarrolló fibrilación auricular crónica dos años después. Fue diagnosticada de HCM apical a los

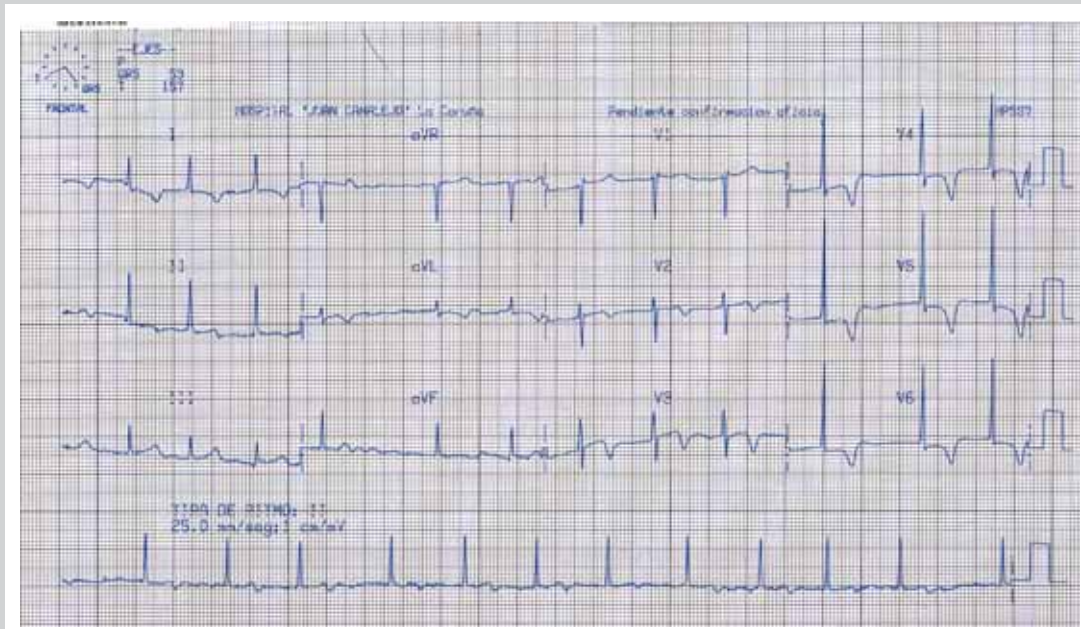
*The index carrier of mutation PLN - 42 C>G was an 85-year-old woman with apical HCM (maximum wall thickness 22 mm at the apex, with normal thickness in the basal segments). This patient had been subjected to cardiological follow-up since the age of 59 years due to episodes of palpitation and chest pain, with normal coronary arteries. She developed chronic atrial fibrillation two years*

**Figura 2.** Ecocardiograma del caso índice con MCH. Imagen telediastólica apical en 4 cámaras (derecha) y dos cámaras (izquierda). Existe una clara hipertrofia apical (22 mm) con grosor normal en segmentos basales. La aurícula izquierda está dilatada.



**Figure 2.** Echocardiogram of the case with HCM. Apical four- (right) and two-chamber (left) end-diastolic view. Clear apical hypertrophy (22 mm) is observed, with normal thickness in the basal segments. The left atrium appears dilated.

**Figura 3.** Electrocardiograma de 12 derivaciones del hermano del caso índice. El ECG con hipertrofia ventricular izquierda y T negativas profundas en ECG es similar al del caso índice y al del hijo con MCH.



**Figure 3.** Twelve-lead electrocardiogram of the male sibling of the index carrier. The electrocardiographic findings in the form of left ventricular hypertrophy with marked negative T-waves are similar to those of the index carrier and offspring with HCM.

67 años (en 1985). En la actualidad, con 88 años está en clase funcional NYHA II, con episodios frecuentes de dolor torácico atípico. La figura 2 muestra imágenes de un ecocardiograma reciente de esta paciente. Su hermano había sido diagnosticado de MCH apical a los 72 años (19 mm en el ápex y grosor normal en los segmentos basales, con hipertrofia ventricular izquierda y T negativas profundas en precordiales izquierdas (figura 3) en el ECG). Estaba en fibrilación auricular desde el diagnóstico, en clase funcional II de la NYHA, con dolor torácico atípico. Murió de forma súbita a los 81 años (muestra de DNA no disponible). De los tres hijos del caso índice, un varón de 59 años, asintomático, presenta MCH apical con hipertrofia ligera en el ecocardiograma (grosor máximo de 15 mm) e hipertrofia ventricular izquierda y T negativas profundas en el ECG. Sus dos hermanos, de 55 y 53 años estaban asintomáticos con ECG y ecocardiograma normales. El estudio genético mostró que el hijo con MCH y uno de sus hermanos con fenotipo normal presentaban la mutación PLN – 42 C>G.

later. Apical HCM was diagnosed at 67 years of age (in 1985). At present, at the age of 88 years, the patient presents New York Heart Association (NYHA) functional class II, with frequent episodes of atypical chest pain. Figure 2 shows a recent echocardiogram corresponding to this patient. Her male sibling had been diagnosed with apical HCM at age 72 (wall thickness 19 mm at the apex, with normal thickness in the basal segments, left ventricular hypertrophy and marked negative T-waves on left precordial leads (Figure 3) of the electrocardiogram). He presented atrial fibrillation from the time of diagnosis and presented NYHA functional class II, with atypical chest pain. This patient suffered sudden death at age 81 (no DNA sample being available).

Of the three offspring of the index carrier, a 59-year-old asymptomatic male has been shown to have apical HCM with slight hypertrophy as evidenced by echocardiography (maximum thickness 15 mm), and left ventricular hypertrophy and marked negative T-waves on the



## DISCUSIÓN

---

El presente estudio muestra que las mutaciones en el gen PLN, que codifica la proteína fosfolamban, no son una causa frecuente de MCD o MCH en nuestro medio. En 81 pacientes con MCD idiopática hemos identificado un polimorfismo en el promotor (PLN – 36 A>C) que no se puede considerar responsable de la enfermedad ya que aparece también en un 5% de los controles sanos. En 105 pacientes con MCH hemos identificado una mutación en el promotor (PLN – 42 C>G) que podría estar asociada con el desarrollo de MCH apical en el caso índice y en sus familiares.

Los datos que apoyan el papel etiopatogénico de esta mutación son: 1- afecta a un residuo conservado en mamíferos (16), 2- no está presente en controles sanos, 3- ha sido identificada en el caso índice y en un familiar afectado, 4- la mutación afecta a una región del promotor importante en la regulación de la transcripción del gen, previamente implicada en la patogenia de la insuficiencia cardíaca y las miocardiopatías primarias (10-12,17-20).

Por otra parte, la existencia de un adulto portador de la mutación sin datos clínicos, electrocardiográficos ni ecocardiográficos de MCH va en contra de la identificación de dicha mutación como causa de la enfermedad. Existen varias explicaciones posibles para esta contradicción. En primer lugar hemos de tener en cuenta que en esta familia la MCH es de presentación y diagnóstico tardío y no podemos descartar que el portador sano desarrolle en algún momento la enfermedad (21). En segundo lugar, es importante señalar que incluso en enfermedades consideradas monogénicas, como la MCH, la influencia de otros factores genéticos y ambientales es determinante en la expresión fenotípica de la enfermedad (3,7,8).

Los datos sobre la implicación del gen PLN en la patogenia de las miocardiopatías primarias son escasos y la evidencia disponible es débil. En lo que respecta a la MCH, sólo existe un trabajo previo en el que se ha descrito una mutación en el gen PLN en un paciente con esta enfermedad (12). En este trabajo no se hizo un estudio familiar y la implicación de esta mutación como causa de la MCH se fundamentó en el estudio de la variación en la actividad transcripcional del gen mutante, que en este caso aumentaba un 80% con respecto al control.

*electrocardiogram. His two siblings, aged 55 and 53 years were seen to be asymptomatic, with normal electrocardiographic and echocardiographic findings. The genetic study showed the son with HCM and one of his two siblings of normal phenotype to present the mutation PLN – 42 C>G.*

## DISCUSSION

---

*The present study shows that mutations of the PLN gene, which encodes for the protein phospholamban, are not a frequent cause of DCM or HCM in our setting. In 81 patients with idiopathic DCM, we observed polymorphism in the promoter (PLN – 36 A>C) that cannot be considered responsible for the disease, since it was also found in 5% of the healthy controls. In 105 patients with HCM we identified a mutation in the promoter (PLN – 42 C>G) that could be associated with the development of apical HCM in the index carrier and her relatives.*

*The data supporting the etiopathogenic role of this mutation are: (a) it affects a preserved residue in mammals (16); (b) it is not present in healthy controls; (c) the mutation has been identified in the index carrier and in an affected relative; and (d) it affects a region of the promoter that is important for transcription regulation of the gene, previously implicated in the pathogenesis of heart failure and primary myocardial pathologies (10-12,17-20).*

*On the other hand, the existence of an adult carrier of the mutation without clinical, electrocardiographic or echocardiographic data of HCM speaks against identification of this mutation as a cause of the disease. There are several possible explanations for this contradiction. Firstly, it must be taken into account that in this family HCM was of late presentation and diagnosis, and it cannot be discarded that the healthy carrier may develop the illness at some time (21). Secondly, it must be pointed out that even in diseases considered to be of a monogenic nature, such as HCM, the influence of other genetic and environmental factors is decisive for phenotypic expression of the pathology (3,7,8).*

*Few data are available on the implication of the PLN gene in the pathogenesis of*



Nuestro trabajo remarca la importancia de los estudios familiares en la determinación de la correlación genotipo-fenotipo.

En conclusión, las mutaciones en el gen PLN no son una causa frecuente de MCH o MCD en nuestra población. La mutación PLN -42C>G podría estar asociada con el desarrollo de MCH apical; pero son necesarios un seguimiento prolongado de los portadores y la realización de estudios funcionales sobre el efecto de esta mutación en la expresión proteica para aclarar su papel patogénico.

*primary myocardial pathologies, and the available evidence is moreover weak. As regards HCM, only one previous study has described a mutation of the PLN gene in a patient with this disorder (12). In the present study no family assessment was made, and the implication of this mutation as a cause of HCM was fundamented on the study of the variation in transcriptional activity of the mutant gene – which in this cases increased 80% with respect to the controls. Our study underscores the importance of family studies in determining genotype-phenotype correlations.*

*In conclusion, mutations of the PLN gene are not a frequent cause of HCM or DCM in our population. The PLN mutation -42C>G could be associated with the development of apical HCM, though prolonged follow-up is required of the carriers, with the conduction of functional studies on the effect of this mutation upon protein expression in order to clarify its pathogenic role.*

## BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. RICHARDSON P, MCKENNA WJ, BRISTOW M, MAISCH B, MAUTNER B, O'CONNELL J, OLSEN E, THIENE G, GOODWIN J, GYARFAS L, MARTIN I, NORDET P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93(5): 841-2.
2. MARON BJ, MCKENNA WJ, DANIELSON GK, KAPPENBERGER LJ, KUHN HJ, SEIDMAN CE, SHAH PM, SPENCER WH, SPIRITO P, TEN CATE FJ, WIGLE ED. ACC/ESC clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Committee to Develop an Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy). *J Am Coll Cardiol* 2003; 42 (9): 1687-713.
3. MCKENNA WJ, MONSERRAT L. Identification and treatment of patients with hypertrophic cardiomyopathy at risk of sudden death. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 123-130.
4. MARON BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. Review. *JAMA*. 2002 Mar 13; 287(10): 1308-20.
5. CHIEN KR. Genotype, phenotype: upstairs, downstairs in the family of cardiomyopathies. *J Clin Invest* 2003; 111:175-178.
6. MONSERRAT L, HERMIDA M, BOUZAS B, MOSQUERA I, MAHON N, PETEIRO J, ALVAREZ N, PENAS-LADO M, CRESPO M, CASTRO-BEIRAS A. Familial dilated cardiomyopathy in patients transplanted for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55(7): 725-32.
7. CASTRO-BEIRAS A, MONSERRAT L, HERMIDA M. Familial dilated cardiomyopathy. Current status and clinical benefits of basic research. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56 (Supl 1): 7-12.
8. MARIAN AJ, ROBERTS R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001: 655-670.
9. RICHARD P, CHARRON P, CARRIER L, LEDEUIL C, CHEAV T, PICHÉREAU C, BENAÏCHE A, ISNARD R, DUBOURG O, BURBAN M, GUEFFET JP, MILLAIRE A, DENOS M, SCHWARTZ K, HAINQUE B, KOMADJA M; EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003; 107: 2227-32.
10. SCHMITT JP, KAMISAGO M, ASAMI M, LI GH, AHMAD F, MENDE U *et al.* Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*. 2003 Feb 28; 299(5611): 1410-3.
11. HAGHIGHI K, KOLOKATHIS F, PATER L, LYNCH RA, ASAMI M, GRAMOLINI AO *et al.* Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy

- revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest.* 2003 Mar; 111(6): 869-76.
12. MINAMISAWA S, SATO Y, TATSUGUCHI Y, FUJINOT, IMAMURA S, UETSUKA Y *et al.* Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Apr 25; 304(1): 1-4.
  13. LEWINTER MM, OSOL G. Normal physiology of the cardiovascular system. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA *et al.* eds. *The Heart.* 10<sup>th</sup> edition. 1998: 67-69.
  14. MCKENNA WJ, SPIRITO P, DESNOS M, DUBOURG O, KOMAJDA M. Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. *Heart* 1997; 77: 130-132.
  15. John Wiley & Sons Current Protocols in Human Genetics. Copyright © 2002. John Wiley & Sons, Inc.
  16. MCTIERNAN CF, FRYE CS, LEMSTER BH, KINDER EA, OGLETREE-HUGHES ML, MORAVEC CS *et al.* The human phospholamban gene: structure and expression. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Mar; 31(3): 679-92.
  17. COTTON RG, SCRIVER CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat.* 1998; 12(1): 1-3.
  18. MINAMISAWA S, HOSHIJIMA M, CHU G, WARD CA, FRANK K, GUY, MARTONE ME, WANGY, ROSS J JR, KRANIAS EG, GILES WR, CHIEN KR. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell.* 1999 Oct 29; 99(3): 313-22.
  19. IWANAGAY, HOSHIJIMA M, GUY, IWATATE M, DIETERLE T, IKEDAY, DATE MO, CHRAST J, MATSUZAKI M, PETERSON KL, CHIEN KR, ROSS J JR. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J Clin Invest.* 2004 Mar; 113(5): 727-36.
  20. HAGHIGHI K, SCHMIDT AG, HOIT BD, BRITTSAN AG, YATANI A, LESTER JW *et al.* Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem* 2001; 276: 24145-52.
  21. Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Proposal for contemporary screening strategies in families with hypertrophic cardiomyopathy. Review. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Dec 7; 44(11): 2125-32.