
Cardiomiopatía hipertrófica familiar: Genes, mutaciones y modelos animales. Revisión.

Carlos Darío Ramírez^{1,2} * y Raúl Padrón¹.

¹Departamento de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y ²Cátedra de Bioquímica, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas, Venezuela. Correo electrónico: carlosdarioamirez@yahoo.es

Palabras clave: Cardiomiopatía hipertrófica, genes, mutaciones, proteínas sarcoméricas, modelos animales.

Resumen. La cardiomiopatía hipertrófica (CMH) es una enfermedad autosómica dominante, cuya prevalencia se ha estimado aproximadamente en 0,2% (1 en 500), siendo probablemente la enfermedad cardiovascular hereditaria más común y la causa más frecuente de muerte súbita. Es una enfermedad cardíaca primaria, en la cual la característica diagnóstica básica es la hipertrofia del ventrículo izquierdo sin dilatación ventricular, en ausencia de cualquier otra enfermedad del corazón o sistémica (hipertensión, enfermedad valvular, etc), que tienda a la hipertrofia del miocardio. Los estudios de genética molecular han identificado once genes que codifican proteínas del sarcómero, y que están asociados con la CMH; el gen de la cadena pesada de la β -miosina cardíaca (*MYH7*), el gen de la cadena pesada de la α -miosina cardíaca (*MYH6*), el gen de la troponina cardíaca T (*TNNT2*), el gen de la troponina I (*TNNI3*), el gen de la troponina C cardíaca (*TNNC1*); el gen de la β -tropomiosina (*TPMI*), el gen de la proteína C enlazadora de miosina cardíaca (*MYBPC3*), y los genes de las cadenas ligera esencial (*MYL3*) y reguladora (*MYL2*) de la miosina. También han sido identificadas mutaciones en los genes de la α -actina cardíaca (*ACTC*) y la titina (*TTN*). El objetivo de este artículo es la revisión del estado actual del conocimiento sobre (1) la estructura y mutaciones de los genes causales de la CMH y sus proteínas (2) los modelos de animales genéticamente modificados desarrollados para el estudio de los genes y mutaciones causales de la cardiomiopatía hipertrófica.

Familial hypertrophic cardiomyopathy: genes, mutations and animal models. A review.

Invest Clín 2004; 45(1): 69 - 99

Key words: Hypertrophic cardiomyopathy, genes, mutations, sarcomeric proteins, animal models.

Abstract. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is an autosomal dominant disease, which may afflict as many as 1 in 500 subjects (0.2%), being probably the most common hereditary cardiovascular disease and the most common cause of sudden cardiac death (SCD). Hypertrophic cardiomyopathy is characterized by the presence of unexplained left ventricular hypertrophy (in absence of hypertension, valvular disease, etc), which is usually asymmetric and involves the ventricular septum. Molecular genetic studies have identified eleven genes that code proteins of the sarcomere that are associated with the HCM; the β -myosin heavy chain gene (*MYH7*), α -myosin heavy chain (*MYH6*), cardiac troponin T (*TNNT2*); cardiac troponin C (*TNNC1*), β -tropomyosin (*TPM1*), myosin binding protein-C (*MYBPC3*), cardiac troponin (*TNNI3*), essential and regulatory light chain genes (*MYL3* and *MYL2*, respectively), cardiac γ -actin gene (*ACTC*) and titin (*TTN*). The objective of this paper is the revision of the current state of the knowledge on (1) the organization and mutations of the HCM causing genes and their proteins and (2) the animal models developed for the study of the genes, mutations and proteins in the hypertrophic cardiomyopathy.

Recibido: 31-03-2003. Aceptado: 21-10-2003.

La cardiomiopatía hipertrófica (CMH) es una enfermedad compleja con características fisiopatológicas únicas y una gran diversidad de características morfológicas, funcionales y clínicas (1). Es una enfermedad cardíaca primaria, en la que la característica diagnóstica básica es la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) sin dilatación ventricular, en ausencia de cualquier otra enfermedad del corazón o sistémica, que tienda a la hipertrofia del miocardio (2, 3). La prevalencia en la población general es de aproximadamente 0,2% (1 en 500), mucho mayor a lo que se pensaba en el pasado (4). Es probablemente la enfermedad cardiovascular hereditaria más común. La mortalidad anual para pacientes con CMH es de 3-4%, y de alrededor de 6% en niños (4). El

curso clínico de la enfermedad varía desde pacientes totalmente asintomáticos, hasta aquellos con síntomas de falla cardíaca y eventualmente muerte súbita. La CMH es la causa más común de muerte súbita entre adultos jóvenes y una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los ancianos (2, 4, 5).

Las primeras observaciones que podemos considerar como una descripción de CMH fueron realizadas a finales del siglo 19 en el Hospital Salpêtrière de Paris por Vulpian (6), quien describió al fenotipo a nivel macroscópico como un "rétrécissement de l' orifice ventrículo-aortique". Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1950 a 1960 que las características clínicas únicas de la cardiomiopatía hipertrófica fueron descri-

tas sistemáticamente (7, 8). La aplicación de metodologías basadas en la genética molecular para obtener mapas genéticos de alta resolución ha facilitado la redefinición de conceptos relacionados a la patología, fisiopatología y diagnóstico de CMH. Los análisis genéticos que facilitan el diagnóstico de la enfermedad en su fase preclínica y la estratificación del riesgo basado en criterios moleculares, harán posible en un futuro próximo, la introducción de la terapia génica.

La cardiomiopatía hipertrófica tiene una gran cantidad de características heterogéneas, en cuanto al punto de vista morfológico, funcional y clínico. El fenotipo está compuesto de hipertrofia ventricular asociada con desorganización miofibrilar. Se ha observado una marcada variación fenotípica relativa a la magnitud y extensión de la hipertrofia del miocardio. La evaluación ecocardiográfica revela una hipertrofia predominante del tabique interventricular de carácter difuso, que comúnmente se extiende a la pared antero-lateral del ventrículo izquierdo (9, 10). El engrosamiento de la pared es cercano a los 20 mm, aún cuando se han reportado medidas entre 15 y 20 mm e incluso menores (entre 13 y 15 mm) (10-12). La forma asimétrica predomina sobre la concéntrica, la cual representa entre el 1 y el 2% de los casos (13). El desarreglo miofibrilar se extiende entre un 5-30% del tejido del miocardio y tiene una baja correlación con el grado de hipertrofia (11).

La cardiomiopatía hipertrófica puede aparecer sin mostrar sus principales características morfológicas. Arritmias y muerte súbita en ausencia de señales ecocardiográficas de hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con el genotipo, indican una expresión fenotípica incompleta (14). Se concluye que el fenotipo está representado por un espectro continuo, que va desde macroscópicamente normal hasta las formas seve-

ras que muestran una masiva hipertrofia del miocardio (15-17).

La complejidad clínica que caracteriza la CMH se hace más evidente cuando se analizan los aspectos genéticos de la enfermedad. En más del 50% de los casos, la CMH es una enfermedad de origen genético autosómica dominante, y en los casos restantes, no se tiene aún una etiología definida, aún cuando se especula que pudiera ser de origen genético, pero con mutaciones en genes aún no descritos. Evaluaciones recientes consideran que los verdaderos casos esporádicos son menores al 10% entre portadores de la enfermedad (15, 18). Tres factores pueden subestimar el diagnóstico de las formas genéticas: la evaluación de familias pequeñas con número reducido de afectados, la adopción de criterios ecocardiográficos muy rígidos, y la presencia de mutaciones con penetración incompleta (16, 19, 20). Las manifestaciones de HVI pueden estar ausentes o tener un carácter subclínico, especialmente entre niños y adolescentes. El electrocardiograma puede ser útil para identificar estos pacientes. Cerca del 50% de los adultos portadores del fenotipo que tienen un grosor de la pared normal al ecocardiograma, tienen alteraciones electrocardiográficas (19).

La gran variabilidad clínica en las familias afectadas por la CMH, sugería la presencia de más de un gen con manifestaciones fenotípicas en común. En 1989, Jarcho y col. (21), empleando análisis de ligamiento, localizaron el primer locus relacionado con la enfermedad, posteriormente descrito como CMH1. Un año después, Geisterfer-Lowrance y col. (22), empleando localización genética (en inglés, *genetic mapping*) y secuenciación del ADN, lograron identificar la mutación puntual que afecta el gen que codifica la cadena pesada de la β -miosina.

Hasta el presente, han sido identificadas más de 100 mutaciones en 11 genes que codifican proteínas del sarcómero: el

gen de la cadena pesada de la β -miosina cardíaca (*MYHC*) (21); el gen de la troponina cardíaca T (*cTnT*) (23); el gen de la troponina C cardíaca (*cTnC*) (24); el gen de la tropomiosina α (*-TM*) (25); el gen de la proteína C enlazadora de miosina cardíaca (*cMyBP-C*) (26); el gen de la troponina cardíaca 1 (*cTN1*) (27); y los genes de las cadenas ligera esencial (*CLE*) y reguladora (*CLR*) de la miosina (*MLC1* y *MLC2*) (28). Recientemente, MacRae y col. (29), identificaron un nuevo locus en formas asociadas con el síndrome de Wolf-Parkinson-White, por lo que se supone que los genes identificados hasta el momento, no representan el espectro completo de los genes responsables de la CMH. También han sido identificadas mutaciones en los genes de la β -actina cardíaca (30) y la titina (31) (Tabla I).

Además de las mutaciones en las proteínas contráctiles sarcoméricas, han sido encontradas mutaciones en dos genes que codifican para proteínas no sarcoméricas. Recientemente fue descrita una deleción en el gen que codifica para el canal de potasio dependiente de voltaje, *KCNQ4*, que se encuentra localizado en el cromosoma 1p34, en una familia con sordera congénita y CMH (32). Más recientemente, fue descrita una mutación puntual en el gen que codifica para la sub-unidad no-catalítica de la proteína quinasa 2 (*PRKAG2*) en dos familias con CMH (33). También han sido asociadas con CMH, mutaciones en los genes mitocondriales que codifican para los ARNt de isoleucina y glicina (34). Por lo tanto, se puede considerar que la forma pura de cardiomiopatía hipertrófica está asociada con

TABLA I
GENES Y MUTACIONES IDENTIFICADOS EN LA CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Gen	Locus	Proteína	Frecuencia	Mutaciones
<i>MYH7</i>	14q11.2-q12	β -MyHC	~35%	>70
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	<i>cMyBP-C</i>	~20%	>40
<i>TNNT2</i>	1q3	<i>cTnT</i>	~20%	>15
<i>TPM1</i>	15q22	β -TM	~5%	>5
<i>TNNI3</i>	19p13.2-q13.2	<i>cTnI</i>	~5%	>4
<i>MYL3</i>	3p21.2-21.3	<i>MLC-1s/v</i>	<5%	>2
<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	<i>MLC-2s/v</i>	<5%	8
<i>ACTC</i>	11q	β -actina cardíaca	<5%	2
<i>TTN</i>	2q24.1	Titina	<5%	1
<i>MYH6</i>	14q	β -MyHC	Rara	2
<i>TNNC1</i>	3p21.3-14.3	troponina C cardíaca	Rara	1
<i>PRKAG2</i>	7q22-q31.1	-Proteína quinasa	<5%	4
<i>KCNQ4</i>	1p34	canal dependiente de K	Rara	1
<i>MTTI</i>	Mitocondria	ADN mitocondrial	Rara	2

Abreviaturas: β -MyHC: cadena pesada de la β -miosina cardíaca. *cMyBP-C*: proteína C enlazadora de miosina cardíaca. *cTnT*: troponina T cardíaca. β -TM: β -tropomiosina. *cTnI*: troponina I cardíaca. *MLC-1s/v*: cadena ligera esencial. *MLC-2s/v*: cadena ligera reguladora. β -MyHC: cadena pesada de la β -miosina cardíaca.

mutaciones en los genes que codifican para las proteínas contráctiles del sarcómero (<http://www.angis.org.au/Databases/Heart/heartbreak.html>). La herogeneidad genética podría en parte justificar la variabilidad clínica entre portadores de la enfermedad. Sin embargo, los hallazgos de que la expresión fenotípica tiene variabilidad intrafamiliar sugieren la participación de otros factores, genéticos (genes modificadores (35) o ambientales). El objetivo de este artículo es la revisión del estado actual del conocimiento sobre (1) la estructura y mutaciones de los genes causales de la CMH (2) los modelos de animales genéticamente modificados desarrollados para el estudio de los genes y mutaciones, y sus consecuencias funcionales.

ESTRUCTURA Y MUTACIONES DE LOS GENES CAUSALES DE CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Los músculos estriados son órganos especializados para la generación rápida de movimiento y fuerza en una dirección específica. La unidad contráctil elemental del músculo es el sarcómero, una máquina macromolecular ordenada, que se encuentra integrada al menos por 28 proteínas dife-

rentes (Fig. 1), entre ellas la miosina y la actina, denominadas proteínas contráctiles que se ensamblan en filamentos poliméricos (los filamentos gruesos y delgados) que interactúan entre sí para generar fuerza y acortamiento del sarcómero; las troponinas y la tropomiosina, que son las proteínas reguladoras del sarcómero, que se enlazan con la actina regulando así la interacción actina-miosina, y por tanto, la contracción en respuesta a cambios en la concentración de Ca^{2+} ; y finalmente, las proteínas estructurales que integran, estabilizan y mantienen la estructura del sarcómero, entre ellas la proteína C enlazadora de miosina, la titina y la nebulina (36).

La miosina es el motor molecular que convierte la energía de la hidrólisis del ATP en trabajo mecánico y movimiento (37), y forma un complejo macromolecular denominado filamento grueso (38, 39), que junto a los filamentos delgados, formados por actina, constituye el sarcómero. La miosina cardíaca es una miosina clase II convencional, que consiste de dos cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras, la reguladora (CLR) y la esencial (CLE) (37, 38). La molécula de miosina es altamente asimétrica, y consiste de dos cabezas globulares unidas

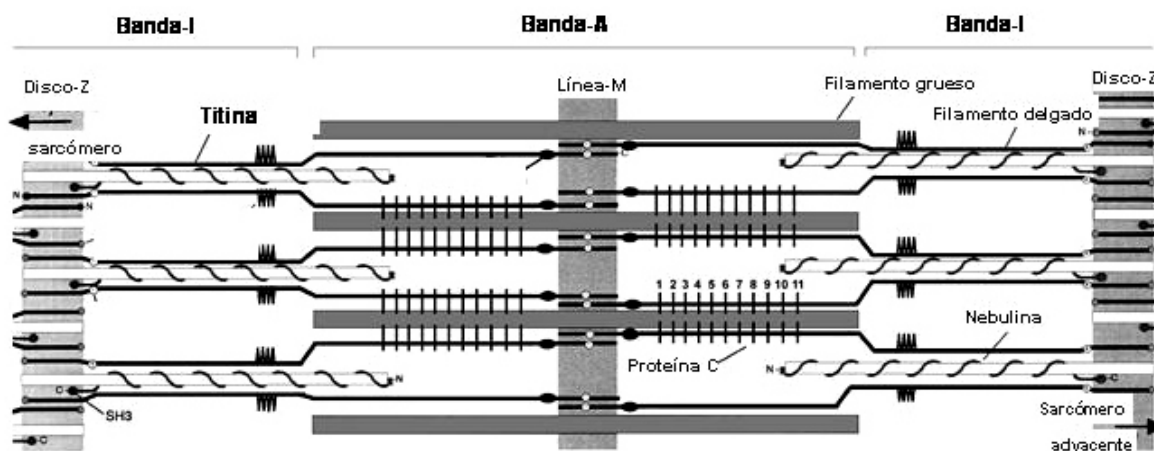


Fig. 1. Organización esquemática de las proteínas del sarcómero asociadas a la CMH. Se destacan las proteínas del filamento grueso, las proteínas asociadas del filamento delgado, la proteína enlazadora de miosina, la titina y la nebulina (Adaptado de Craig y Padrón) (36).

a una larga cola en forma de bastón. Las cadenas ligeras están arregladas de forma consecutiva en la unión cabeza cola. Aun cuando su función no está completamente entendida, la identificación de mutaciones en las cadenas ligeras, esencial y reguladora de la miosina, en familias con un subtipo de CMH, el conocido en inglés como MVC (Mid-Ventricular Chamber) (28, 40, 41), ha demostrado que dichas mutaciones afectan el proceso de fosforilación y/o la capacidad de unión de Ca^{2+} . La fosforilación de la CLR tiene un importante papel fisiológico en la regulación del músculo cardíaco (42). Además, la relación entre fosforilación y la unión de Ca^{2+} a la CLR juega un papel clave en el trabajo cardíaco (37). Existe una evidencia sustancial de que la CLR juega un papel regulador primario en la contracción del músculo liso, pero su papel funcional en la contracción del músculo estriado de mamífero (esquelético y cardíaco) no está claro (42). La CLR, junto con la cadena ligera esencial, estabilizan la α -hélice del cuello de la cabeza de miosina, con el extremo N-terminal de la CLR envuelto alrededor de la cadena pesada. La contracción del músculo liso es iniciada por la fosforilación de la CLR con una quinasa de la cadena ligera activada por Ca^{2+} -calmodulina (en inglés, MLCK, myosin light chain kinase). Sin embargo, en músculo esquelético y cardíaco, la fosforilación de la CLR no activa la contracción, pero parece jugar un papel modulador (43). El complejo de troponina y tropomiosina constituye el interruptor sensible al calcio que regula la contracción de las fibras musculares cardíacas. Se han encontrado varias mutaciones en la β -tropomiosina y en dos de las sub-unidades del complejo de troponina: cTNI, la unidad inhibitoria, y cTnT, la subunidad enlazadora de la tropomiosina. Igualmente, la función de cMyBP-C es incierta, pero por más de una década ha existido evidencia que indica, tanto funciones estructurales como re-

guladoras. La extracción parcial de la cMyBP-C de miocitos cardíacos de rata y de fibras de músculo esquelético de conejo, altera la tensión calcio-sensible (44). También se demostró que la fosforilación de la cMyBP-C altera las cabezas de miosina en los filamentos gruesos intactos, lo cual sugiere que la cMyBP-C puede modificar la producción de fuerza en músculos cardíacos activados (45). La miosina y la cMyBP-C son parte de los filamentos gruesos del sarcómero, con la cMyBP-C localizada al nivel de las estriaciones transversales, distanciadas 43 nm, tal y como ha sido visualizada por microscopía electrónica en la banda A del sarcómero (Fig. 1) (36, 46). Las troponinas y la tropomiosina están localizadas en el filamento delgado. Cada una de estas proteínas está codificada por una familia de multigenes, que exhiben patrones de expresión regulados, tejido-específicos, de desarrollo y fisiológicos.

Los genes *MYH7* y *MYH6*

La β -miosina cardíaca es la principal isoforma del ventrículo humano (47). Cerca del 35% de los casos de CMH son causados por mutaciones en este gen (Tabla I) (17). La cadena pesada de la miosina es, por su masa, el principal componente del filamento grueso del sarcómero y proporciona la función motora de la contracción cardíaca. La miosina es una proteína hexamérica que está formada por dos cadenas pesadas (PM aproximado de 220 kDa) y 2 pares de cadenas ligeras no idénticas. Las cadenas pesadas están formadas por 2 dominios separados: una cabeza globular unida a una cola α -helical por una región de bisagra. Las cabezas, localizadas en el extremo amino-terminal de la molécula, contienen la región catalítica de la ATPasa, y un lugar de unión de la actina. Además, las cadenas ligeras están unidas a cada cabeza por la región de unión cabeza-cola, también llamada "cuello" o "sub-fragmento-1" (S1). Dos isoformas

mas de cadenas pesadas se expresan en el corazón, la β y la γ . Las isoformas β y γ están codificadas por los genes *MYH6* y *MYH7*, respectivamente, y están organizadas de forma continua y agrupadas en el cromosoma 14q11.2-q13, con el gen *MYH7* localizado a 4 kilobases (kb) por encima del *MYH6*. El gen *MYH7* está compuesto por 40 exones y codifica para un ARNm de 6 kb y una proteína de 220 kDa, con 1935 aminoácidos (Fig. 2) (48). Las isoformas β y γ están organizadas como homodímeros V1 y V3, respectivamente. Bajo determinadas condiciones, puede estar presente una forma heterodimérica intermediaria llamada V2, que está constituida por los productos génicos de β y γ . Los homodímeros V1 y V3 tienen diferentes actividades ATPásicas intrínsecas, siendo V1 la más activa (alrededor de tres a cuatro veces más). Estas diferentes isoformas están presentes en cantidades variables, y existe una buena correlación entre la velocidad de contracción y la relación de V1/V3. Así, el ventrículo humano contiene fundamentalmente V3 (49, 50), mientras que el ventrículo de ratón adulto, que alcanza una frecuencia de 500-800 latidos por minuto, contiene V1.

Del total de más de 70 mutaciones reportadas, la mayoría de ellas está localizada en los primeros 23 exones, que codifican para el dominio motor y el dominio regulador de la cabeza de miosina (Tabla I) (51). Este gen es altamente susceptible a mutagénesis, en especial los codones 403, 719 y 741 (52, 53). También han sido encontradas dos deleciones de tres pares de bases que no afectan el marco de lectura, una en el codón 10 (54) y otra en el codón 930 (55), y una deleción de 2,4 kb en la región 3' (56). En la familia con esta última mutación, únicamente el probando había desarrollado hipertrofia clínicamente diagnosticada a una edad muy tardía (a la edad de 59 años). Finalmente, se encontró por azar un codón de terminación en la posición 54, en la madre (38 años de edad) y en la abuela (70 años de edad) de un joven afectado (16 años), quién había heredado de su padre afectado una mutación con pérdida de sentido en el exón 22 (57). El alelo correspondiente a la mutación con pérdida de sentido debería codificar una variante corta de la proteína, que comprende sólo los primeros 53 aminoácidos de la molécula, aunque esto no representa las caracterís-

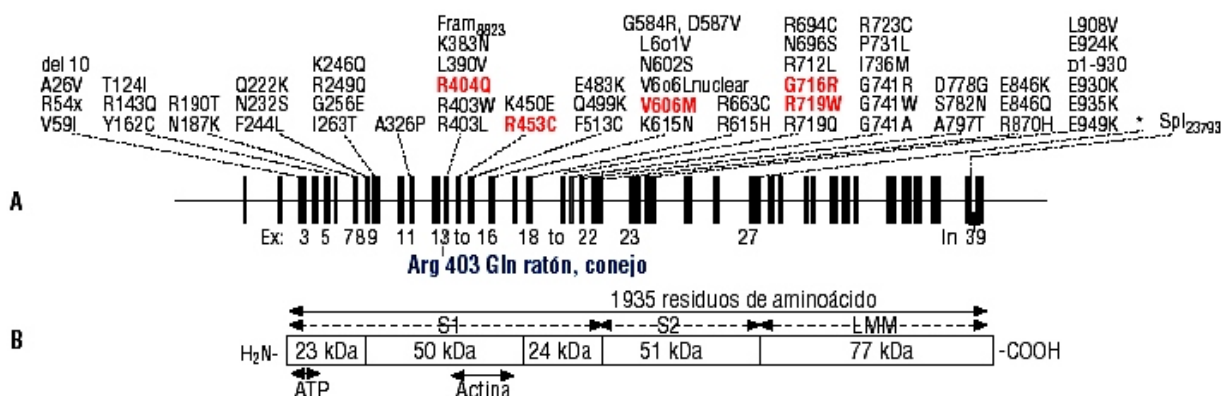


Fig. 2. Las mutaciones de la cadena pesada β de la miosina asociadas a la CMH. (A). Organización intrón-exón y las mutaciones descritas. Las mutaciones que han sido estudiadas en modelos animales genéticamente modificados se muestran debajo del diagrama intrón-exón. (B). Representación esquemática de la proteína β -MyHC codificada por el gen *MYH7*, con sus dominios y lugares de unión (adaptado de Dalloz y col.) (113).

ticas de una mutación causante de enfermedad, puesto que las dos mujeres no estaban clínicamente afectadas.

Con el propósito de examinar las consecuencias estructurales de las mutaciones en el gen *MYH7*, Rayment y col. (58) han realizado estudios en los que localizan 29 de las mutaciones reportadas en este gen, sobre la estructura cristalográfica de la miosina S1 esquelética de pollo, que muy posiblemente sea similar a la S1-MyHC de humano. Veinticuatro de las mutaciones no parecen ocurrir al azar, y en lugar de ello, se agrupan en cuatro posiciones: la interfase de unión a la actina, alrededor del sitio de enlazamiento del nucleótido, adyacentes a la región que conecta a los dos residuos de cisteína y, finalmente, en la proximidad de la interfase de la cadena pesada con la cadena ligera esencial. Las cinco restantes se encuentran en la cola de miosina (Fig. 2).

La secuencia nucleotídica completa del gen *MYH6* fue reportada por Epp y col. (59). Este gen contiene 26,1 kb distribuidas en 39 exones, 37 de los cuales contienen información codificadora. La región 5' no-transcrita se divide en tres exones, el último de los cuales contiene el codón de iniciación AUG. Con la excepción del intrón 13 del gen *MYH7*, que no está presente en la isoforma, todos las demás regiones intrón-exón están conservadas.

Recientemente, Niimura y col. (60) describieron un individuo quien había desarrollado síntomas de CMH a la edad de 74 años. En el análisis mutacional fue encontrada una transición G>A en el exón 20 del gen *MYH6*, la cual sustituye una glutamina por arginina en la posición 795 (R795Q). Esta arginina está altamente conservada entre especies, así como también en miosinas de músculo cardíaco, esquelético y liso dentro de especies. Además, la arginina 795 está localizada dentro del dominio de unión de la proteína a través del cual la cadena

pesada de la miosina interactúa con las cadenas ligeras. Los autores sugieren que la sustitución de un residuo de glutamina hidrofílico en este sitio, puede ejercer su efecto interfiriendo con la interacción de las cadenas ligeras.

Los genes *MYL2* y *MYL3*

Dos tipos únicos de cadenas ligeras de la miosina se unen al dominio regulador de la cabeza de la miosina: la esencial (CLE o MLC1) y la reguladora (CLR o MLC2). Estas pequeñas proteínas parecen desempeñar papeles estructurales y reguladores en la función de la miosina, estabilizando el largo cuello α -helical de la miosina y afectando su rigidez o dureza (61). Pertenecen a la superfamilia de las proteínas "EF-hand", que incluye la calmodulina y la troponina C, entre otras proteínas. La CLE de la miosina ventricular contiene 195 residuos de aminoácidos (PM aproximado de 21,8 KDa), está codificada por el gen *MYL3* localizado en el cromosoma 3p21.2-p21.3, constituido por 7 exones (Fig. 3). La CLR está compuesta por 166 residuos de aminoácidos (PM aproximado de 18,7 KDa), está codificada por el gen *MYL2* localizado en el cromosoma 12q23-q24.3, con 7 exones (Fig. 3). La CLR puede ser fosforilada a través de la vía de la proteína quinasa A.

El concepto de que las mutaciones en las cadenas ligeras de la miosina pueden causar CMH, apareció como consecuencia de los numerosos resultados que apuntaban a que las alteraciones en otras proteínas sarcoméricas podían causar la enfermedad. Además, un grupo importante de mutaciones de la MyHC se habían localizado en los dominios involucrados en la unión a las cadenas ligeras, lo que implicaba a esta región como una zona crítica para el funcionamiento normal de las proteínas motoras. Actualmente se han identificado mutaciones tanto en la CLE como en la CLR (Fig. 3). Existen dos mutaciones con pérdi-

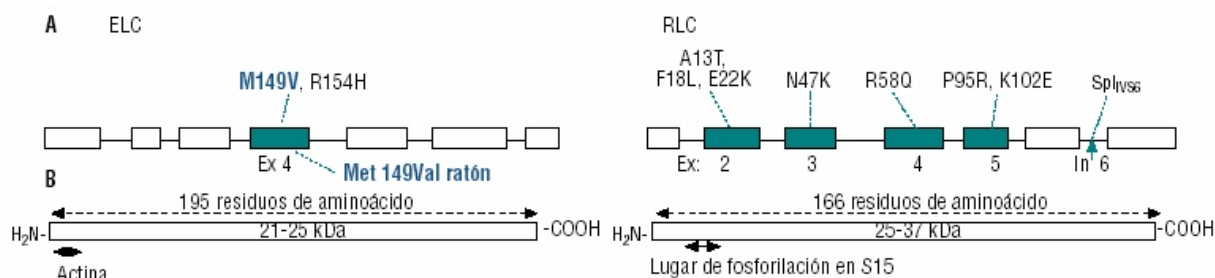


Fig. 3. Las mutaciones de las cadenas ligeras de la miosina implicadas en la CMH. (A). Se indican las mutaciones descritas y la organización intrón-exón. Las mutaciones que han sido estudiadas en modelos animales genéticamente modificados se muestran debajo del diagrama intrón-exón. (B). Representación esquemática de las proteínas CLE y CLR codificadas por los genes respectivos *MYL3* y *MYL2*, con los sitios de unión importantes (adaptado de Dalloz y col.) (113).

da de sentido en la CLE en los residuos de aminoácidos conservados M149V y R154H que están asociados a la enfermedad (28, 62). Los estudios de estructura/función demuestran que existe un aumento en la velocidad de traslocación de la actina en ensayos de motilidad *in vitro* (28, 62). También se han identificado 7 mutaciones con pérdida de sentido y una mutación por truncamiento en la CLR (28, 40). Más de la mitad de estas mutaciones (A13T, F18L, E22K, P95R) tienen lugar en residuos de aminoácidos muy conservados, y mediante modelos animales se demostró que estas mutaciones pueden producir la eliminación del sitio de fosforilación. Esto, a su vez, puede tener efectos sobre la flexibilidad del dominio regulador de la miosina. Otras dos mutaciones han sido identificadas recientemente (63); la N47K, localizada en el sitio de unión de Ca^{2+} , y la IVS6-1g>c en el intrón 6, que produce un procesamiento erróneo con pérdida del exón 7. Los autores sugieren que un cambio en la afinidad por el Ca^{2+} puede ser el mecanismo fisiopatológico de la mutación N47K. En el caso de la mutación por procesamiento erróneo, este cambio traería como consecuencia la truncación de la proteína con pérdida del sitio de unión de la miosina. La delección del carboxilo terminal elimina la regulación me-

diada por la fosforilación de la contracción en el músculo liso (64, 65). Tal y como ocurre con las mutaciones de la MyHC, las mutaciones de la CLR muestran una expresión variable y una penetración incompleta.

Las mutaciones en las cadenas ligeras están asociadas con un fenotipo cardíaco raro y sorprendente, que consiste de una hipertrofia masiva de los músculos papilares y del tejido ventricular adyacente, causando una obstrucción medio-ventricular (28). Las mutaciones de la MLC pueden interferir con la respuesta de estiramiento-activación del músculo papilar y del tejido ventricular adyacente, una propiedad que sólo se ha encontrado en porciones del corazón que aumentan su potencia (66).

El gen *TNNT2*

En el músculo cardíaco, han sido descritas múltiples isoformas de cTnT que se expresan en el corazón del feto y del adulto, y en el corazón enfermo, que son el resultado del procesamiento alternativo ("alternative splicing") del gen único *TNNT2* (67-70). La relevancia fisiológica de estas isoformas no está claramente entendida. El gen *TNNT2* fue localizado por el análisis de híbridos de células somáticas y por fluorescencia *in situ* al cromosoma 1q32 (70, 71). La organización estructural y la secuencia

nucleotídica completa han sido determinadas en la rata por Jin y col. (71), y las primeras mutaciones de CMH fueron numeradas de acuerdo a esta estructura de la rata (72). El gen humano fue parcialmente establecido por Forissier y col. (73), lo que permitió la localización precisa de las mutaciones dentro de los exones, incluyendo aquellas que se procesan alternativamente durante el desarrollo, y también usar una nomenclatura que refleja el potencial codificador del gen *TNNT2* humano.

El gen *TNNT2* se compone de 17 exones que se extienden sobre 17 kb y dan lugar a múltiples isoformas por el uso, tanto de exones alternativos como de sitios aceptores alternativos (Fig. 4). La isoforma cardíaca comparte la estructura completa y la función de otras isoformas de troponina. Es una molécula asimétrica de alrededor de 37 kDa cuya porción amino-terminal contiene un lugar de fosforilación que es el sitio de unión de la proteína quinasa C, así como un lugar para la unión de la región C-terminal de la tropomiosina. La región carboxilo-terminal contiene un lugar de unión para la -tropomiosina dependiente de calcio y lugares de unión para la TnC, TnI y, posible-

mente, para la actina. Existen tres lugares potenciales para la fosforilación, que pueden regular la cinética del entrecruzamiento al disminuir la tasa máxima de actividad de la ATPasa (74). La proteína desempeña un papel estructural importante al colocar al complejo de troponina a lo largo del filamento delgado. Además, la TnT confiere sensibilidad al calcio a la actividad inhibitoria del complejo cTnI-cTnC sobre la ATPasa de la actomiosina (75).

Las mutaciones en el gen *TNNT2* son responsables de aproximadamente el 20% de los casos de CMH (Tabla I) (73, 76). Hasta la fecha se han descrito 16 mutaciones; 14 son mutaciones con cambio de codón distribuidas a lo largo de la molécula, 1 es una mutación del lugar de corte y empalme (72), y una es una delección en el marco de lectura (76). Estas dos últimas producen una proteína truncada. A pesar de esta diversidad, la presentación clínica es muy similar, caracterizada por una hipertrofia indetectable, leve o moderada; una penetración incompleta, con pronóstico pobre y una alta incidencia de muerte súbita cardíaca en la adolescencia o en la edad adulta temprana. En esta clase altamente maligna,

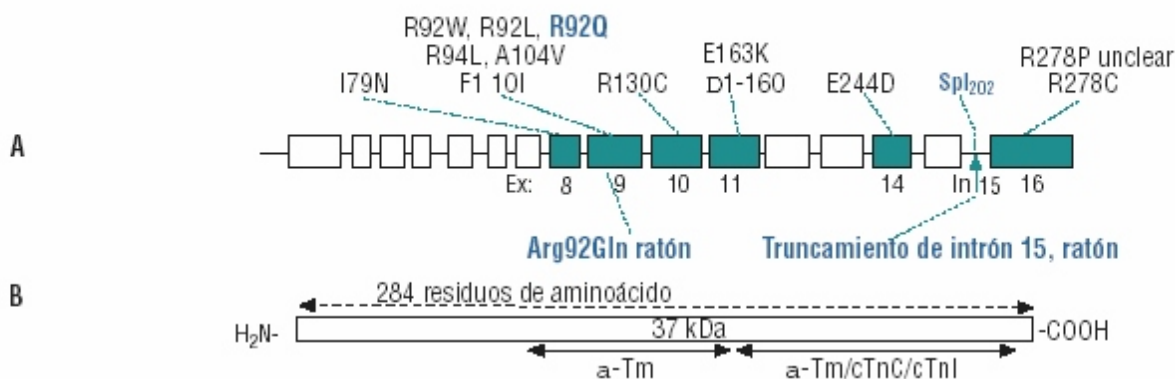


Fig. 4. Las mutaciones en la troponina T cardíaca (cTnT) en la CMH. (A). Se indican las mutaciones descritas y la organización intrón-exón. Las mutaciones que han sido estudiadas en modelos animales genéticamente modificados se muestran debajo del diagrama intrón-exón (B). Representación esquemática de la proteína cTnT codificada por el gen *TNNT2*, con sus lugares de unión (adaptado de Daloz y col.) (113).

el desarrollo de la hipertrofia cardíaca puede ocurrir independientemente de la muerte súbita, lo que distingue este fenotipo de las mutaciones de la proteína motora, miosina. Al menos 6 mutaciones tienen un pronóstico pobre: I79N, R92Q, A104V, Ed1160, e IVS15-202g>a (72, 76). La única excepción es F110I, la cual afecta el 13% de las familias con una mutación del gen de la troponina T cardíaca; en Japón esto está ocasionalmente asociado con hipertrofia atípica (77). Como en las mutaciones benignas de MyHC, ningún cambio ocurre en la carga del aminoácido que involucra uno de los sitios principales de unión con la molécula de la α -actina cardíaca.

Se ha descrito una mutación del gen *TNNT2*, asociada con desarreglo miofibrilar extenso sin un incremento en la masa y muerte súbita en una familia (14). La mutación involucra el exón 9 con una sustitución de arginina por leucina en el codón 94 (R94L), que produce un cambio en la carga y en la conformación de la proteína. Puede deducirse que la hipertrofia puede no ser el factor que determine la muerte súbita en la CMH, y en lugar de ello, lo sea el desarreglo de la miofibrilla asociado con la fibrosis. En el año de 1999, se describió una mutación, R278C, en un paciente de 67 años de edad, quién 10 años atrás, estaba normal desde el punto de vista clínico y electrocardiográfico (78). Todos los casos conocidos hasta ese momento habían comenzado en la adolescencia. Se puede concluir que esta mutación del gen *TNNT2* puede llegar a manifestarse tardíamente, justificando los casos de muerte súbita en la edad adulta, en individuos asintomáticos, con una hipertrofia ventricular leve o normal.

El gen *TNNI3*

La TnI es la sub-unidad inhibitoria del complejo de troponina. El corazón humano tiene una isoforma específica que se caracteriza por tener un extremo amino-terminal

de 33 aminoácidos que no tienen las isoformas esqueléticas. La TnI se une a la actina, lo que previene la actividad ATPásica de la miosina. La inhibición por esta unidad se vuelve reversible en presencia de calcio, que se une a la cTnC e induce un cambio conformacional en el complejo de la troponina que produce la liberación de la actividad inhibitoria de la cTnC, permitiendo la contracción. La isoforma cardíaca presenta unas propiedades únicas, que incluyen la unión cooperativa a la actina-tropomiosina (79). La proteína está constituida por 210 aminoácidos, con un peso molecular de 30 KDa, y está codificada por el gen *TNNI3*, localizado en el cromosoma 19p13.2-q13.2, y compuesto de 8 exones (Fig. 5). La TnI cardíaca contiene varios dominios funcionales. En el extremo amino-terminal existen dos lugares que pueden ser fosforilados por la proteína quinasa A (serinas 23 y 24). La fosforilación disminuye la sensibilidad de los miofilamentos al calcio, e inhibe la unión cooperativa a la actina. Las serinas que se encuentran en las posiciones 42 y 44 pueden ser fosforiladas por la proteína quinasa C; la fosforilación reduce la actividad máxima ATPásica. Una región inhibitoria que se une a la actina y a la cTnC produce relajación a través de la inhibición de la interacción con la actomiosina. Finalmente, el extremo carboxilo-terminal parece ser esencial para la sensibilidad de los miofilamentos al calcio (80).

Las mutaciones en la cTnI también están asociadas con la CMH (Tabla I) (27). Hasta el presente han sido descritas 8 mutaciones, 7 mutaciones con pérdida de sentido y una delección, todas localizadas en los exones 3, 7 y 8 (Fig. 5). Tres mutaciones (R145G, R145Q y R162W) se localizan en la región inhibitoria, y las otras están en el extremo carboxilo de la molécula. Las consecuencias funcionales siguen siendo desconocidas. Estas mutaciones producen una hipertrofia ventricular que, en algunos casos, puede estar restringida al ápice (27).

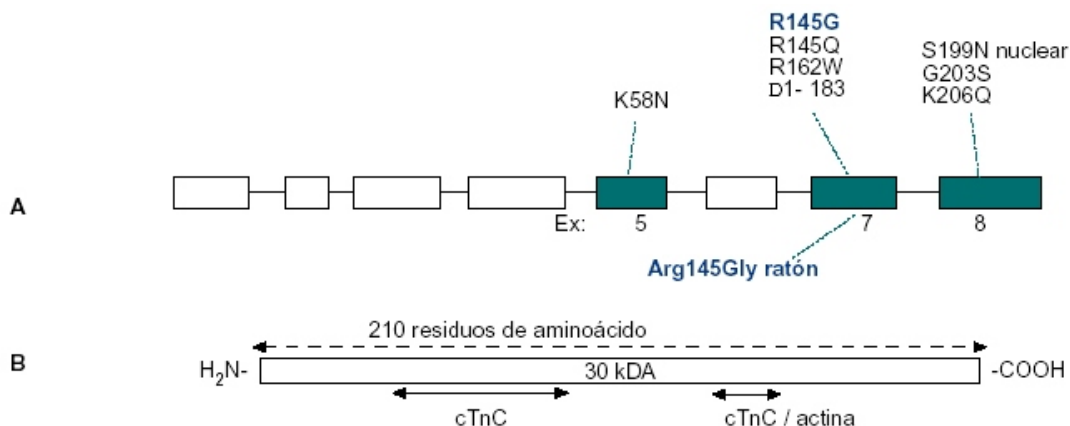


Fig. 5. Las mutaciones de la troponina I cardíaca (cTnI) en la CMH. (A). Se indican las mutaciones descritas y la organización intrón-exón. Las mutaciones que han sido estudiadas en modelos animales genéticamente modificados se muestran debajo del diagrama intrón-exón (B). Representación esquemática de la proteína cTnI codificada por el gen *TNNI3*, con sus lugares de unión (adaptado de Daloz y col.) (113).

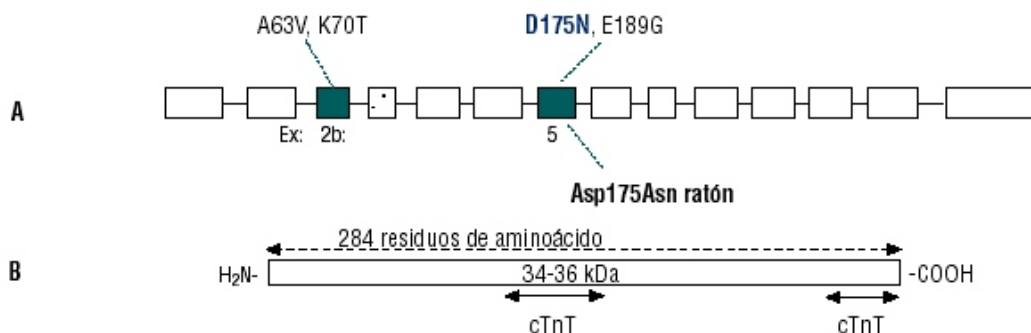


Fig. 6. Las mutaciones en la β -tropomiosina (β -Tm) en la CMH. (A). Se indican las mutaciones descritas y la organización intrón-exón. Las mutaciones que han sido estudiadas en modelos animales genéticamente modificados se muestran debajo del diagrama intrón-exón (B). Representación esquemática de la β -Tm codificada por el gen *TPM1*, con sus lugares de unión (adaptado de Daloz y col.) (113).

El gen *TPM1*

La tropomiosina (Tm) es una proteína rígida en forma de bastón que se une a todo lo largo del filamento de actina y al complejo de troponina, que regula la interacción sensible al calcio de la actina y la miosina. En el corazón adulto, la isoforma predominante es la β -tropomiosina de músculo estriado, compuesta por 284 aminoácidos (PM aproximado de 34-36 kDa). Un mecanismo de corte y empalme alternativo del gen *TPM1* genera la β -tropomiosina. El gen está

localizado en el cromosoma 15q22 y consiste de 14 exones (Fig. 6). La β -tropomiosina contiene dos dominios de unión TnT, uno dependiente de calcio y otro independiente de calcio en la región carboxilo-terminal de la molécula que une la tropomiosina al complejo de troponina. La β -tropomiosina estabiliza el filamento y lo hace más rígido y, en ausencia de calcio, bloquea el lugar de unión de la actina a la miosina. También desempeña un papel en la determinación del grado de cooperatividad y sensibilidad al calcio.

Las mutaciones en el gen *TPM1* representan aproximadamente el 5% de las mutaciones responsables de CMH (Tabla I). Hasta el presente han sido identificadas 6 mutaciones con sentido erróneo, dos en el exón 2 (A63V, K70T) que pueden alterar la unión de la α -tropomiosina a la actina (81,82), tres en el exón 5 (D175N, E180G, E180V), que pueden afectar la unión a la TnT dependiente de calcio (71, 81, 83), y una en el exón 3 (V95A) (84), que incrementa la afinidad por el calcio, con un fenotipo leve y pronóstico pobre; 13 muertes en 26 afectados, 11 de las cuales fueron muerte súbita y dos relacionadas con fallas cardíacas.

El gen *MYBPC3*

La proteína C enlazadora de miosina (MyBP-C) es una proteína grande, con un PM de aproximadamente 130 KDa, y con 1274 aminoácidos. La localización cromosómica fue realizada por fluorescencia *in situ* en el cromosoma 11p11.2, y su posición precisa fue determinada por localización de híbridos entre los loci *DIIS4133* y *DIIS1326* (85, 86). La organización estructural y la secuencia de la proteína fueron determinadas recientemente (87). La iso-

forma cardíaca tiene 35 exones, y contiene tres dominios únicos de isoforma, algunos de los cuales pueden modular la contracción vía fosforilación por la proteína quinasa A y/o proteína quinasa dependiente de calmodulina (Fig. 7). La MyBP-C, que es el principal componente del filamento grueso, se une tanto a los filamentos gruesos como a la titina. La MyBP-C se encuentra localizada en la región C de la banda A, y tiene una organización única, con 7-9 bandas axiales en cada mitad sarcomérica (Fig. 1). Como otras proteínas que se unen a la miosina, la MyBP-C pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) intracelulares, y está compuesta por dominios Ig y fibronectina repetidos (88).

Las mutaciones en el gen de la MyBP-C cardíaca son responsables de aproximadamente el 20% de los casos de CMH (Tabla I). Se ha descrito un número importante de mutaciones (>40), la mayoría de las cuales resulta de mutaciones del lugar de corte y empalme, inserciones y deleciones (89, 90), que producen proteínas truncadas. La mayoría de los truncamientos ocurre en el dominio carboxilo-terminal, que contiene un lugar para la unión de la miosina

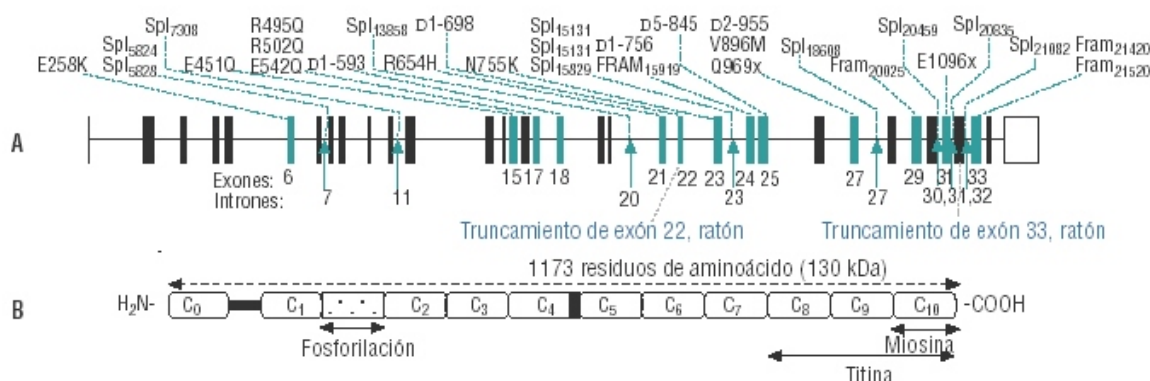


Fig. 7. Las mutaciones de la proteína C enlazadora de miosina (MyBP-C) en la CMH. (A). Se indican las mutaciones descritas y la organización intrón-exón. Las mutaciones que han sido estudiadas en modelos animales genéticamente modificados se muestran debajo del diagrama intrón-exón (B). Representación esquemática de la proteína MyBP-C codificada por el gen *MYBPC3*, con sus dominios y lugares de unión (adaptado de Dalloz y col.) (113).

na, estando presente unas veces sí y otras no el lugar de unión para la titina. Sorprendentemente, la enfermedad no se presenta sino hasta la quinta o sexta década de vida, y se caracteriza por un comienzo tardío de la CMH, con presentación incompleta y un perfil clínico relativamente benigno (91), que contrasta con otras mutaciones genéticas sarcoméricas más malignas. Debido al comienzo tardío, la evolución benigna y la predominancia de individuos asintomáticos con hipertrofia leve, la prevalencia de estas mutaciones puede estar subestimada. Por lo tanto, la detección de pacientes sospechosos de tener CMH debería incluir a pacientes de todos los grupos de edad, incluyendo a los adultos considerados saludables en evaluaciones clínicas previas (92).

El gen *ACTC*

La actina ha sido identificada en muchas clases de células incluyendo las musculares, donde es el mayor constituyente del filamento delgado. La α -actina cardíaca fue aislada y caracterizada por Hamada y col. en 1982 (93). Esta proteína consta de 377 residuos de aminoácidos. Las actinas están involucradas en la generación de la fuerza dentro del sarcómero y en la transmisión de la fuerza desde el sarcómero al tejido adyacente. De acuerdo con su papel funcional, se conoce que la actina interactúa directamente con el filamento grueso, a través de la MyHC, otros polipéptidos del filamento delgado (la troponina I y la β -tropomiosina), las cadenas ligeras y las proteínas de anclaje, como la actinina y la distrofina (Fig. 1) (74). Empleando un fragmento de ADN complementario de un exón del gen de la α -actina cardíaca en estudios de híbridos de células somáticas, Shows y col. (94) demostraron que el gen estaba codificado por un segmento en el cromosoma 15q11-qter. Posteriormente, por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) fue asignado el gen a 15q14.

Las primeras mutaciones (A297S y M307) del gen *ACTC* fueron identificadas por Mogensen y col. (30), cercanas a un sitio que previamente había sido descrito como productor de cardiomiopatía dilatada, estos investigadores fueron los primeros en demostrar que mutaciones en genes sarcoméricos eran responsables de dos diferentes cardiomiopatías (Tabla I). Estas dos mutaciones están cercanas al sitio de unión de la miosina, y pueden afectar dicha unión. Recientemente (95), han sido identificadas tres mutaciones nuevas; E101K, que produce un cambio de carga neta en la proteína y forma un enlace electrostático débil en el sitio de unión de la actomiosina; P166A, que se encuentra adyacente a la región de interacción entre los monómeros de actina en la doble hélice del filamento de actina; A333P, adyacente al sitio de interacción actina-miosina.

El gen *TTN*

La titina, con un peso molecular aproximado de cerca de 3000 kDa, es el polipéptido más grande conocido y una proteína abundante del músculo estriado. Sus moléculas están encadenadas y se extienden desde la línea M a la Z en el sarcómero. La asignación definitiva del locus al cromosoma 2q24.3 (96), fue realizada empleando un mapa de híbridos de radiación, en la vecindad de los marcadores *D2S384* y *D2S364*. Labeit y Kolmerer (97) determinaron la secuencia del ADN complementario de la titina cardíaca humana. Este ADN de 82 kb predice una proteína de 244 copias de dominios tipo inmunoglobulina y de fibronectina III. La arquitectura de las secuencias en la región de la banda A de la titina sugieren el por qué la estructura del filamento grueso está conservada en los vertebrados. En la región de la banda I, la comparación de las secuencias de la titina de músculos de diferente tensión pasiva identificó 2 elementos que se correlacionan con

la rigidez del tejido. Esto sugiere a los autores que la titina puede actuar como dos resortes en serie. La expresión diferencial de los resortes provee una explicación molecular para la diversidad en la longitud del sarcómero y la tensión en reposo del músculo estriado de los vertebrados. En un estudio para determinar la interacción de la titina con otras proteínas sarcoméricas, Freiburg y Gautel (98) determinaron que la CMH debida a mutaciones en la titina, puede ser el resultado de un mal ensamblaje del filamento grueso por la eliminación de la interacción terciaria de la titina, la miosina y la proteína C enlazadora de miosina cardíaca. Hasta el presente sólo ha sido identificada una mutación en la titina asociada con CMH, la R740L, que se encuentra localizada dentro del sitio de unión de la α -actinina, en el exón 14, y al parecer aumenta la afinidad a la proteína (Tabla I) (31).

CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA EN MODELOS ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Los modelos animales de enfermedades hereditarias humanas han servido de base para comprender los efectos fenotípicos de las diferentes mutaciones. La transgénesis y la reconstrucción génica (“gene targeting”) en el ratón proporcionan herramientas para modificar el genoma de los mamíferos y la dotación proteica motora del corazón. Dirigiendo la expresión de una proteína modificada por ingeniería genética directamente al corazón, es posible remodelar de manera efectiva el perfil proteico cardíaco y estudiar la consecuencia de una única manipulación genética a nivel molecular, bioquímico, citológico y fisiológico, tanto en condiciones normales como patológicas.

Modelos animales del gen *MYH7*

Los dos primeros modelos animales de la CMH que se desarrollaron fueron realiza-

dos con el propósito de estudiar la mutación R403 del gen *MYH7* (99, 100), empleando la técnica de reconstrucción génica. En el primer modelo, se introdujo la mutación por recombinación homóloga; de manera que, los heterocigotos tenían un alelo normal y otro mutado. El otro modelo se generó por la expresión transgénica de una proteína β -MyHC de rata que portaba la mutación R403Q asociada con una deleción en el sitio de unión de la actina, de manera que el ratón transgénico tenía dos alelos normales más uno mutado (100). Estos sistemas son considerados heterólogos, puesto que el gen mutado de la proteína humana β -MyHC fue introducido en el ratón β -MyHC. La proteína β -MyHC tiene una alta actividad ATPásica y está adaptada al corazón del ratón, mientras que la α -MyHC, con baja actividad ATPásica, está adaptada al humano. A pesar de esto, los resultados de estos estudios dieron la primera base genética de la CMH. En los humanos la mutación sólo está presente en forma heterocigótica y, de acuerdo con esta observación, el ratón homocigoto muere a los pocos días de nacer (100). Los individuos heterocigotos sedentarios sobrevivieron, lo que demuestra que la presencia de la mutación R403Q da lugar a una función cardíaca anómala pero compatible con la vida. Los heterocigotos presentaron la misma histopatología y fisiopatología, que se había observado en la forma humana de la CMH (101-103). La disfunción cardíaca precedió los cambios histopatológicos y, la desorganización miocitaria, hipertrofia y fibrosis aumentaron con la edad (99).

Las evaluaciones de las consecuencias funcionales de la mutación R403Q a nivel molecular (104) han dado como resultado que la actividad cíclica de la actina está acelerada, y ésta puede ser la causa de la mayor velocidad en el aumento de la presión observada *in vivo* (101), así como de la mayor velocidad en el desarrollo de la fuer-

za en fibras musculares (105). Esta ganancia de función es consistente con el fenotipo hemodinámico observado en los humanos, y probablemente estimula el desarrollo de una hipertrofia compensatoria que no es debida a una disminución en la capacidad de generar fuerza sino que, por el contrario, está relacionada con la demanda energética crónicamente aumentada en el miocardio. En este modelo, la hipertrofia compensatoria aumentaría la masa tisular para reducir el estrés de la pared y la utilización energética por unidad de volumen del miocardio. Esto puede ser validado en experimentos en donde se mida la fuerza y la velocidad de desplazamiento de la β -MyHC humana y de los filamentos delgados reguladores del corazón.

Modelos animales de los genes *MYL2* y *MYL3*

Las diversas mutaciones de las cadenas ligeras reguladoras han sido asociadas con un fenotipo con hipertrofia del músculo papilar, y para validar la hipótesis de que esto refleja un efecto común sobre la función de la miosina, han sido generados ratones transgénicos con fragmentos genómicos humanos grandes (alrededor de 12 kb) que contienen la mutación M149V. Tales ratones reproducen el fenotipo (106). El modelo hizo posible estudiar la respuesta de estiramiento-activación antes que los corazones fuesen deformados en el proceso hipertrofico, y ha confirmado que la respuesta de estiramiento-activación puede desempeñar un papel en el corazón de los mamíferos, ofreciendo una nueva vía para modular la función cardíaca humana. Otro modelo de ratón transgénico en el que el lugar susceptible de ser fosforilado es eliminado, ha demostrado la importancia de esta modificación que tiene lugar después de la traducción (107). Con el propósito de determinar la relación causal de las mutaciones en las cadenas ligeras y el fenotipo de CMH, fue

desarrollado un modelo de ratón en donde se expresaban las formas mutadas o las normales, utilizando clones de ADN complementario que contenían sólo las regiones codificadoras de los loci genéticos. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes, ya que cuando niveles importantes de expresión resultaban en un reemplazamiento de la proteína endógena por la forma mutada en un 50% o más, no se detectaba hipertrofia, incluso en animales de edad avanzada (108). Aunque los cambios ocurrieron a nivel de los miofilamentos y de las células, y las miofibrillas mostraban una sensibilidad aumentada al calcio y déficit significativo en la relajación de forma relacionada con la dosis transgénica, no apareció hipertrofia ni en los cardiomiocitos ni en las cámaras cardíacas. Debido a la discordancia entre estos datos y los obtenidos con ratones transgénicos que contenían el fragmento genómico humano, la opinión actual de que estas mutaciones son por sí mismas las causantes de la hipertrofia cardíaca debe ser reevaluada. En un trabajo reciente, James y col. (109), desarrollaron un modelo de conejo transgénico en donde el ADN complementario de la CLE fue aislado y secuenciado, la mutación M149V fue realizada y el ADN complementario fue colocado con el promotor de la β -MyHC, el cual dirige la expresión cardíaca en el ventrículo del conejo. Múltiples líneas de conejos transgénicos mostraban diferentes niveles de reemplazo de la proteína, y no se observó un patrón discernible de la enfermedad, a nivel estructural o funcional en los estados neonatales, juveniles o adultos. Los autores concluyen que la mutación M149V no es la causa de la CMH cuando es expresada en el conejo, en el contexto de la proteína endógena. Estos resultados sugieren la implicación de otros factores, tales como los genes modificadores y/o factores ambientales (35), que podrían modular la expresión fenotípica de los genes mutados.

Modelos animales del gen *MYBPC3*

Las mutaciones en el gen de la MyBP-C cardíaca en su mayoría producen una proteína truncada (87-90), y el enfoque transgénico es una buena herramienta para investigar los efectos patológicos de estas mutaciones, que se producen en la quinta o sexta década de vida, por la posibilidad de estudiar la severidad y progresión de la enfermedad y su relación con los niveles de expresión de la proteína. Dado que se ha postulado la haplo-insuficiencia funcional como uno de los probables mecanismos de producción del fenotipo, ya que la misma no se podía encontrar en biopsias de pacientes (87), se construyeron dos modelos de ratones transgénicos. El primer modelo reemplazó aproximadamente la mitad de la MyBP-C cardíaca con una proteína que carecía de los dominios para unirse a la miosina y la titina (110). La proteína truncada que se codificaba era estable, pero no se podía incorporar de manera eficiente en el sarcómero, lo que sugería que la proteína no actuaba como un "péptido tóxico". Las anomalías fisiopatológicas y estructurales en los ratones estaban relacionadas con la dosis, e ilustraban las consecuencias estructurales causadas por la insuficiente incorporación de MyBP-C funcional en el ensamblaje sarcomérico y/o por la incorporación del polipéptido aberrado. La disgenesia sarcomérica era prevalente, lo que indica que son necesarias cantidades normales de la proteína original para la integridad estructural de los sarcómeros de los cardiomiocitos. El fenotipo leve desarrollado por los ratones reproduce el fenotipo clínico relativamente benigno que se observa en ciertas mutaciones. No obstante, se ha postulado que este fenotipo puede variar dependiendo de la mutación. Para probar esta hipótesis, se generó un segundo modelo de ratón transgénico que expresa en el corazón una forma mutante de la MyBP-C que carece del lugar de la unión de la miosina

(111). De acuerdo a lo esperado para esta mutación, sólo se encontraron niveles modestos de la proteína, lo que concuerda con los datos obtenidos de biopsias humanas en los que la proteína mutada no pudo ser detectada. A pesar de los niveles normales de la proteína endógena, se observaron cambios significativos en la estructura y ultra-estructura del corazón. La mecánica de la fibra estaba alterada, observándose una disminución en la velocidad de acortamiento, en el acortamiento máximo y en la fuerza máxima relativa. Este modelo apoya el concepto de "péptido tóxico" de la proteína mutada.

Los modelos transgénicos de la MyHC ilustran algunos de los puntos importantes concernientes a la utilidad del enfoque general. En primer lugar, un modelo animal de roedor pequeño, puede reproducir fielmente elementos de la patología humana. En segundo lugar, la tasa relativamente rápida con la que estos modelos pueden ser generados permite demostrar la diversidad de los mecanismos fisiopatológicos que pueden resultar en una CMH, en la que están involucradas diferentes mutaciones del mismo gen (*MYBPC3*). Debido al número limitado de investigaciones que pueden realizarse en humanos, los modelos de ratón proporcionan una oportunidad única para descubrir procesos patogénicos que evolucionan gradualmente a lo largo de la vida del animal (112, 113).

Se ha generado un modelo de ratón transgénico "knockout" con el propósito de evaluar la función de la MyHC y comprender el mecanismo de producción de CMH producto de mutaciones en el gen *MYBPC3* (112). Los autores produjeron cepas de ratones con pérdida de la MyHC, producto de delección de los exones 3 a 10 de la MyHC endógena cardíaca. Los ratones heterocigotos para la mutación (+/-) fueron indistinguibles de los normales (+/+), mientras que los homocigotos para la mutación (-/-)

mostraron una hipertrofia cardíaca importante. La evaluación ecocardiográfica de los ratones mostró una disminución importante de los índices de función sistólica y diastólica en los homocigotos para la mutación. La sensibilidad al calcio estaba reducida en los ratones homocigotos pero no en los heterocigotos. Estos resultados establecen que la MyHC no es esencial para el desarrollo cardíaco, pero la ausencia de la MyHC da como resultado una profunda hipertrofia cardíaca y una función contráctil defectuosa.

Modelos animales del gen *TPM1*

Para estudiar las consecuencias funcionales de las mutaciones de β -Tm, se han generado ratones transgénicos que expresan la mutación con sentido erróneo D175N en el compartimiento cardíaco (114). La expresión de la proteína mutante estuvo asociada con una disminución recíproca en los niveles endógenos de β -Tm. Cuando el reemplazo excedía el 50% de la β -Tm endógena, se producía una disminución de la contractilidad y de la relajación en preparaciones de corazón funcionante. Mediante ecocardiografía se pudo ver que los ratones transgénicos exhibían una función ventricular normal, pero respondían menos vigorosamente al ejercicio y a la estimulación adrenérgica del tipo β . Sin embargo, la esperanza de vida era normal, tal como ocurre en algunos pacientes. Histológicamente se apreciaba una ocurrencia variable de desorganización miocítica, hipertrofia y fibrosis. La mutación, que está localizada en el área de unión de la β -Tm a la TnT, puede deteriorar las ya de por sí débiles interacciones TnT- β -Tm que se producen en esta región, alterando la sensibilidad de los miofilamentos al calcio. Para probar esta hipótesis, se aislaron fibras de músculos papilares a las que se eliminó la membrana celular. La mecánica y cinética de estas fibras, tanto de los corazones de ratón mutante

como de los músculos humanos, mostraron una sensibilidad aumentada al calcio (115).

Los datos complementarios esenciales para ayudar a entender la patogenia de la CMH relacionada con las mutaciones de la β -Tm proceden de un modelo de ratón "knockout" en el que el gen de la β -Tm fue eliminado por reconstrucción génica (116). Tal como se esperaba, los ratones "knockouts" homocigotos no fueron viables. Sin embargo, los ratones heterocigotos apenas presentaron cambios en la estructura o función cardíacas, lo que demuestra que el ratón puede afrontar fácilmente la haploinsuficiencia del gen de la β -Tm. Estos datos sugieren fuertemente que las anomalías cardíacas debidas a mutaciones de la β -Tm no están asociadas a haploinsuficiencia, como ocurre con las eliminaciones del gen de la β -MyHC, siempre que asumamos que los músculos cardíacos humano y de ratón son similares. Es interesante señalar que el ARNm total estaba disminuido en un 50% en los ratones heterocigotos. Sin embargo, el ARNm unido a los polisomas (es decir, el que se traduce activamente a proteína), así como los niveles de proteína, fueron similares a los que presentaron las camadas del tipo original, lo que sugiere que la cantidad relativa de ARNm que se traduce no está afectada, y que la regulación de la traducción desempeña un papel importante en el control de la expresión de la β -Tm (117). Estos hallazgos implican que en los heterocigotos los mecanismos reguladores mantienen el nivel de β -Tm miofibrilar a pesar de la reducción en el ARNm de la β -Tm, y explican por qué la inactivación de uno de los alelos de la β -Tm no causa la patología observada en la CMH.

Un modelo de animal transgénico fue empleado recientemente para investigar los efectos de dos mutaciones en la β -Tm humana, D175N y E180G, empleando ensayos de motilidad *in vitro* con una β -Tm humana recombinante, expresada con un amino-ter-

minal de alanina-serina (AStm) para emular la acetilación *in vivo*, y troponina cardíaca humana nativa (118). Los autores reportan un incremento en la sensibilidad al calcio en las fracciones de filamentos, cuando se comparan la tropomiosina mutada con la normal. Las medidas indirectas de la fuerza en los filamentos reconstituidos con la AStm mutada producían la misma fuerza comparada con los filamentos normales. Estos resultados muestran efectos diferentes de las mutaciones de la CMH en la tropomiosina comparados con los sistemas heterólogos previamente descritos (117). Estos autores demuestran, al realizar experimentos paralelos con la troponina cardíaca humana o la troponina esquelética de conejo, que el fenotipo cardíaco específico de las mutaciones de la CMH en la β -Tm no es el resultado de cambios funcionales más marcados cuando interactúa con la troponina cardíaca.

Modelos animales del gen *TNT2*

Para intentar resolver la diversidad de mecanismos que conducen a la enfermedad humana, se han reproducido en 3 modelos de ratones, los efectos de una mutación diferente de la cTnT que corresponde a la mutación con pérdida de sentido R92Q. Estos modelos, que expresaron niveles variables de la proteína mutada, exhibieron fenotipos diferentes, pero presentaron una característica común: la ausencia de hipertrofia. En consecuencia, la cantidad de proteína mutada puede desempeñar un papel importante a la hora de determinar el fenotipo de la enfermedad, y puede estar involucrada en la presentación heterogénea observada en una población de pacientes que tienen una mutación idéntica (alternativamente, otros genes modificadores pueden ser responsables de la presentación variable). Cuando sólo se expresaban niveles bajos de la proteína mutante, el corazón del ratón presentaba una desorganización de

los miocitos cardíacos, un aumento del contenido intersticial de colágeno y una disfunción diastólica, fenotipos similares a los encontrados en la CMH humana (119). En estos casos, la enfermedad humana ocurre probablemente a través de un efecto negativo dominante en el cual la función alterada de los cardiomiocitos y la desorganización son las anomalías primarias, y la hipertrofia un proceso compensatorio. Cuando se obtuvieron niveles más altos de expresión de la proteína mutante en dos laboratorios diferentes, los ratones transgénicos presentaron un fenotipo distinto, en el cual el deterioro de la función cardíaca global era un efecto primario y tenía lugar independientemente del desarrollo de las anomalías histológicas de la CMH. Aparte de este mecanismo de acción crucial y común, cada uno de los 2 modelos transgénicos presentó unas características distintivas propias, que pueden reflejar la expresión clínica heterogénea de la enfermedad, debida a diferencias en el fundamento y/o factores del entorno. Los ratones transgénicos que sobre-expresan el ADN complementario mutante humano controlado por el potente promotor de β -MyHC de ratón, mostraron una disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (en inglés, LVEF) (120), en contraste con la LVEF normal que se había encontrado en pacientes humanos. Este tipo de discordancia puede representar también uno de los límites en el uso de modelos animales genéticamente modificados, y en la extrapolación de los resultados desde el ratón a la enfermedad humana.

En otro modelo de ratón transgénico, que utilizó un ADN complementario mutante de ratón controlado por el promotor de la β -MyHC de rata (106), los niveles elevados de la proteína mutante (30, 67 y 92% del total de cTnT), estuvieron asociados con alteraciones dependientes de la dosis. Estas alteraciones incluyeron ventrículos izquier-

dos más pequeños, una inducción significativa del factor natriurético atrial y transcritos β -MyHC en los corazones (un patrón transcripcional característico de la respuesta hipertrófica), y patología mitocondrial. Sin embargo, cuando son expresados niveles elevados de la cTnT mutante, la mutación puede actuar como un “cambio en la función” más que como un “péptido tóxico”, lo que explica las diferencias fenotípicas observadas entre modelos que exhiben varios niveles de la proteína mutante. En cada uno de estos modelos, es importante enfatizar que la estequiometría global de la proteína no estaba modificada. Es decir, la cantidad de cTnT mutante + cTnT endógena equivalía a los niveles de cTnT observados en los animales normales no modificados, lo que indica que la forma endógena es reemplazada por la cTnT mutante en grado variable. En conjunto, estos modelos de ratón demuestran que los diferentes alelos de la cTnT están asociados con fenotipos distintos, lo que sugiere que la heterogeneidad clínica de la MHF es, al menos parcialmente, debida a mecanismos específicos de los alelos.

En el futuro, la información procedente de los modelos de ratón modificados por ingeniería genética será complementada por estudios de terapia génica. Esto permitirá la expresión temporal de una proteína mutada en el corazón. Recientemente, Yu y col. han expresado la cTnT mutante R92Q en el corazón adulto de conejo mediante una inyección intramiocárdica directa de los adenovirus recombinantes (121). En contradicción con los estudios a largo plazo *in vivo* y a corto plazo *in vitro*, la proteína mutante se incorporó en el sarcómero sin inducir una desorganización temprana en los miocitos y en los sarcómeros, lo que sugiere que la incorporación miofibrilar prolongada de la cTnT mutante es esencial para su efecto negativo dominante sobre la estructura de los miocitos cardíacos en el miocardio intacto.

En un intento por elucidar los mecanismos por los que las mutaciones en la cTnI pueden producir el desarrollo de MHF, se han realizado análisis *in vitro* utilizando complejos de troponina cardíaca humana reconstituida que expresan las formas mutantes de cTnI: R145Q y R136W. Estas 2 mutaciones disminuyeron la inhibición de la actividad ATPásica bajo condiciones de relajación, y aumentaron la sensibilidad de la enzima al calcio. *In vivo*, esto se puede traducir en un empeoramiento de la relajación y una contractilidad alterada, lo que puede constituir el estímulo hipertrófico que conduce a una CMH (122). James y col. (123) también han probado el mecanismo patogénico de la enfermedad *in vivo*, generando ratones transgénicos que contienen la mutación con pérdida de sentido R145G. Los animales desarrollaron una patología similar a la CMH humana, con hipertrofia en los cardiomiocitos y fibrosis intersticial. Las alteraciones funcionales a nivel del órgano entero incluyeron hipercontractilidad con disfunción diastólica, y se caracterizaron a nivel de la fibra por un aumento en la sensibilidad al calcio. Sin embargo, el fenotipo en los animales fue mucho más severo, con aparición frecuente de muerte cardíaca súbita y un acortamiento drástico de la esperanza de vida. Esta diferencia puede ser atribuida a las características del corazón de ratón, que tiene que realizar ciclos muy rápidos de sístole a diástole, y tiene que ser por lo tanto más sensible (que el corazón humano) a las perturbaciones en el manejo del calcio.

PATOGÉNESIS DE LA CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las mutaciones causan un arreglo diverso de los efectos iniciales en la estructura y función de las proteínas sarcoméricas. Los tipos de mutaciones,

su localización, y la función de la proteína afectada son importantes para la diversidad de los defectos iniciales. Sin embargo, a pesar de lo anterior, el fenotipo final es la hipertrofia cardíaca, fibrosis y el desarreglo. Las vías intermediarias que conectan los defectos iniciales con el fenotipo final, aún hoy en día son desconocidas. En general, parece que los fenotipos iniciales son principalmente funcionales, seguido por el fenotipo molecular, los cuales son probablemente fenotipos intermediarios, y subsecuentemente fenotipos estructurales.

La mayoría de las mutaciones en la CMH son mutaciones con cambio de codón, que parecen no interferir con el ensamblaje inicial y la alineación apropiada de los miofilamentos y sarcómeros. Por lo tanto, las proteínas con este tipo de mutaciones funcionan como “péptidos tóxicos”, que ejercen un efecto negativo dominante sobre la función del miocito que sigue a su incorporación dentro de las miofibrillas (22). Las mutaciones por delección o truncación que eliminan el codón de terminación, o el sitio de poliadenilación, o codifican proteínas truncadas, que son probablemente degradadas inmediatamente después de la traducción (56), pueden alterar la estequiometría de las proteínas sarcoméricas. Estas mutaciones pueden funcionar como “alelos nulos” y ejercer su efecto a través de la haplo-insuficiencia. Los experimentos de reconstrucción génica en ratones, sugieren que la “haplo-insuficiencia” puede ser gen-específica, puesto que la eliminación de una copia del gen murino β -MyHC tiene como consecuencia, la alteración en la estructura del sarcómero y la disfunción del miocardio. En contraposición, la eliminación de una copia de la β -tropomiosina no induce anormalidades funcionales o morfológicas (116, 117).

Los datos experimentales y clínicos sugieren que la hipertrofia cardíaca, es producto de un fenotipo compensatorio. La hipertrofia ventricular a menudo ocurre en

etapas avanzadas o está ausente en un número significativo de pacientes que han heredado la mutación causal de la enfermedad. Los estudios de estructura-función en cardiomiocitos adultos y en corazones intactos, sugieren que las anormalidades funcionales preceden a la hipertrofia cardíaca en individuos con CMH (119-122). Un estudio reciente ha mostrado que las velocidades de contracción-relajación están reducidas en humanos con la mutación, aún en ausencia de hipertrofia cardíaca detectable (124). Similarmente, la contracción del miocardio y la velocidad de relajación están reducidas en ratones transgénicos (β -MyHC-Q403) previas al desarrollo de la hipertrofia cardíaca o la fibrosis intersticial (124). Además, los estudios de transferencias de genes en cardiomiocitos adultos mostraban una función anómala, previa al desarrollo de desarreglo miofibrilar o del sarcómero (119-122). Es más, miotubos esqueléticos y fibras musculares, aisladas de músculo esquelético de pacientes con CMH, mostraban generación de fuerza reducida en ausencia de anormalidad estructural (125, 126). Finalmente, los miocitos aislados de ratones transgénicos que expresan la proteína mutada β -MyHC muestran un rendimiento mecánico anormal (102). Colectivamente estos resultados sugieren que el deterioro funcional precede a los cambios estructurales en la CMH.

La hipertrofia cardíaca, la respuesta habitual del miocardio a todas las formas de estrés, comúnmente se desarrolla tardíamente en los humanos con CMH. Varias líneas de evidencia sugieren que la HVI es un proceso compensatorio debido a un impulso no claramente definido de las proteínas sarcoméricas (Tabla II). Como se ha discutido previamente, el defecto primario inducido por las proteínas mutadas es diverso y, la unión entre los defectos primarios y la subsiguiente evolución de la HVI todavía es desconocida.

TABLA II
EVIDENCIAS QUE APOYAN EL CONCEPTO DE HIPERTROFIA COMPENSATORIA
EN LA CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA

1. Rendimiento mecánico del cardiomiocito dañado que sigue a la expresión de proteínas sarcoméricas mutadas en ausencia de anormalidades estructurales.
2. Regulación aumentada de la expresión de los marcadores moleculares de la hipertrofia, tales como péptidos atriales y del cerebro, endotelina-1, TGF β 1 e IGF-1.
3. Presencia predominante de hipertrofia en el ventrículo izquierdo (cámara de presión alta) a pesar de la expresión de la proteína mutada β -MyHC en la cámara derecha (cámara de baja presión).
4. La hipertrofia ventricular izquierda está afectada por el trasfondo genético (genes modificadores) y los factores ambientales.
5. Remodelado de la hipertrofia en el ventrículo izquierdo seguido de la ablación septal y alivio del gradiente de salida.
6. Reversión de la hipertrofia y la fibrosis intersticial en modelo de ratones transgénicos de la CMH por el bloqueo de la angiotensina II, el receptor 1, o con simvastatina.

Varios autores han propuesto que las proteínas sarcoméricas mutadas causan un arreglo diverso de defectos iniciales que convergen en un fenotipo común de función cardíaca dañada, y un subsiguiente desarrollo de hipertrofia compensatoria, fibrosis y desarreglo del tejido (127) (en la Fig. 8 se muestran las mutaciones que se han reportado hasta el presente para la molécula de miosina II). De acuerdo a este modelo, el defecto común en la CMH, sin tener en cuenta la diversidad de las mutaciones causales y los defectos iniciales, es la función mecánica dañada de los cardiomiocitos, lo cual incrementa el estrés del miocito y tiende a la activación de las señales intracelulares de las quinasas y de factores tróficos. Colectivamente las señales de las quinasas y los factores tróficos tienden a la hipertrofia cardíaca, fibrosis intersticial y otras características clínicas del fenotipo de la CMH (127). Otros estímulos son aportados por la sensibilidad alterada al calcio, reducida actividad ATPásica, y disgenesia del sarcómero. De acuerdo a esto, la hipertrofia del miocito y el desarreglo, la fibrosis intersticial, y el engrosamiento de las arterias

coronarias, son un fenotipo secundario y potencialmente reversible. Otros mecanismos celulares, tales como la atrofia de los cardiomiocitos y la pérdida de los mismos por apoptosis, ha sido implicados en los modelos animales, pero su significado en los humanos aún está por establecerse.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los recientes avances en la elucidación de los factores genéticos implicados en la cardiopatía hipertrófica, han dado como resultado la identificación de 11 genes que codifican para proteínas del sarcómero, además de otros genes no sarcoméricos: *PRKAG2*, *KCNQ4*, y una mutación en un ARNt mitocondrial. Los estudios de correlación genotipo-fenotipo muestran que las mutaciones y el ambiente genético afectan la expresión fenotípica de la cardiomiopatía. El fenotipo final es el resultado de la interacción de los genes causales, genes modificadores y muy probablemente factores ambientales. Aun cuando la patogénesis molecular no está claramente definida, los

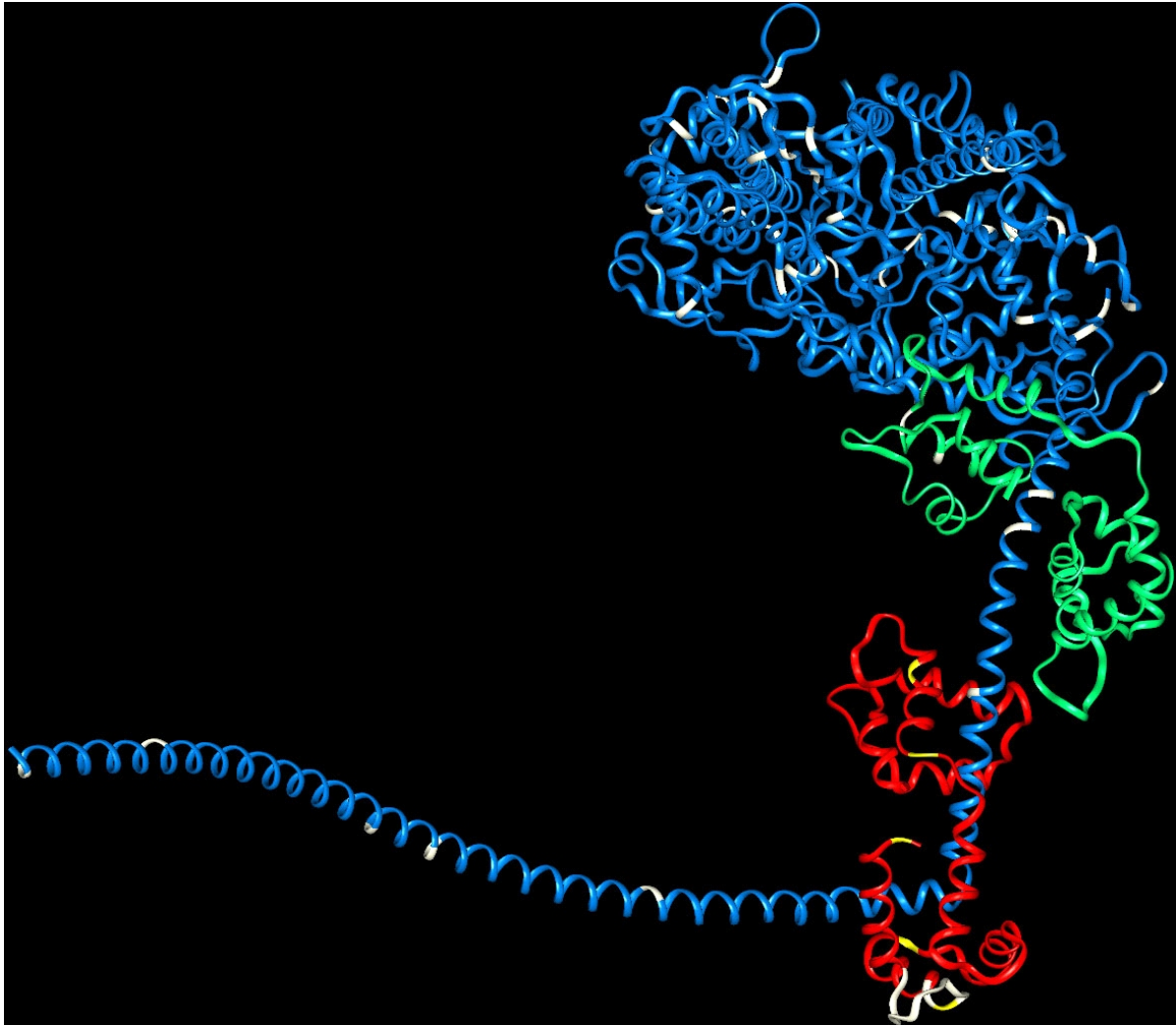


Fig. 8. Representación tridimensional de la estructura del fragmento S1 humano, basada en la estructura cristalográfica del S1 de pollo (Rayment y col.) (37), mostrando además parte del bastón (134, 135). Las cadenas pesada, reguladora y esencial de la miosina se muestran en color azul, rojo y verde, respectivamente. Las mutaciones de acuerdo a la secuencia y cambios reportados en la base de datos de la CMH (<http://www.angis.org.au/Databases/Heart/heart-break.html>) y el Swiss-Prot (accession numbers P12883, Q14904, Q14908, Q16579 y P10916) se muestran en color blanco para las cadenas pesada y esencial, y en color amarillo para la cadena reguladora. Para esta última cadena, se muestra en color blanco el dominio de unión de calcio entre los aminoácidos 37 y 48. Esta figura fue preparada empleando el programa MODELLER (136).

defectos iniciales causados por las proteínas mutadas, convergen en una ruta común de función cardíaca anormal, que tiende a un incremento en el estrés de los miocitos y a una activación subsiguiente de señales intracelulares de las quinasas y de factores tróficos, los cuales activan la maquinaria transcripcional induciendo la hipertrofia cardíaca, fibrosis intersticial y el desarreglo de los miocitos, que son las características patológicas de la CMH. Los estudios en animales transgénicos, muestran que la hipertrofia cardíaca, la fibrosis intersticial y el desarreglo de los miocitos son potencialmente reversibles (128-131). Tales hallazgos realzan la posibilidad de reversión del fenotipo que evoluciona o la posibilidad de prevenir el fenotipo en los humanos con CMH. La existencia de nuevos genes involucrados en la CMH (24) y la heterogeneidad en la expresión fenotípica de la enfermedad, ponen de manifiesto la existencia de otros factores genéticos y ambientales que contribuyen a desarrollar la cardiomiopatía. La elucidación de las bases moleculares y la patogénesis de la CMH podría darnos la oportunidad de un diagnóstico genético, la estratificación del riesgo en los afectados y en los portadores sanos, y la aplicación de medidas preventivas y terapéuticas en aquellos individuos que hayan heredado la mutación causal de la enfermedad (132-133).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Lic. Lorenzo Álamo, del Departamento de Biología Estructural del IVIC por su apoyo en la preparación de la figura 8. Este trabajo ha sido financiado en parte por FONACIT de Venezuela. La investigación de C.D.R. fue financiada por una beca Post-doctoral del IVIC en el Departamento de Biología Estructural. The research of R.P. was supported in part by an International Research Scholars

Grant from the Howard Hughes Medical Institute (HHMI), USA.

REFERENCIAS

1. **Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ.** The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997; 33: 775-785.
2. **Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyrfas I, Martin I, Nordet P.** Report of the World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-842.
3. **Davies MJ, McKenna WJ.** Hypertrophic cardiomyopathy: an introduction to pathology and pathogenesis. *Br Heart J* 1994; 72 (Suppl.): S2-S3.
4. **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. *Circulation* 1995; 92:785-789.
5. **Malik MS, Watkins H.** The molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 1997; 12:295-302.
6. **Vulpian A.** Contribution à l'étude des rétrécissements de l'orifice ventriculo-aortique. *Arch Physiol* 1868; 3:220-222.
7. **Brock R.** Functional obstruction of left ventricle (acquired subvalvular aortic stenosis). *Guy's Hosp Rep* 1957; 106: 221-238.
8. **Teare D.** Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J* 1958; 20:1-8.
9. **Wigle D, Sasson Z, Handerson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H, Williams WG.** Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of the site and the extent of hypertrophy. *Prog Cardiovasc Dis* 1985; 28:1-83.
10. **Klues H, Schiffers A, Maron BJ.** Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic

- cardiomyopathy: morphologic observations and significance as assessed by 2-dimensional echocardiography in 600 patients. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1699-1708.
11. **Maron BJ.** Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 1997; 350:127-133.
 12. **Sharma S, Elliot PM, Whyte G, Mahon N, Virdeee M, McKenna WJ.** Utility of metabolic exercise testing in distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from physiologic left ventricular hypertrophy in athletes. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:864-870.
 13. **Maron BJ, Gottdiener JS, Epstein SE.** Patterns and significance of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a wide range two-dimensional echocardiographic study of 125 patients. *Am J Cardiol* 1981; 48:418-428.
 14. **Varnava A, Baboonian C, Davison F, de la Cruz L, Elliott PM, Davies MJ, McKenna WJ.** A new mutation of cardiac troponin T causing familial hypertrophic cardiomyopathy without left ventricular hypertrophy. *Heart* 1999; 82:621-624.
 15. **McKenna WJ.** The future in hypertrophic cardiomyopathy: important clues and potential advances from understanding of the genotype phenotype relationship. *Ital Heart J* 2000; 1:17-20.
 16. **Schwartz K, Carrier L, Guicheney P, Komadja M.** Molecular basis of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 91:532-540.
 17. **Maron BJ, Moller JH, Seidman SE, Vincent GM, Dietz HC, Moss AJ, Towbin JA, Sondheimer HM, Pyeritz RE, McGee G, Epstein AE.** Impact of laboratory molecular diagnosis on contemporary diagnostic criteria for genetically transmitted cardiovascular diseases: hypertrophic cardiomyopathy, long-QT syndrome, and Marfan syndrome. *Circulation* 1998; 98:1460-1471.
 18. **Marian AJ, Roberts R.** Recent advances in molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92:1336-1347.
 19. **Hagège AA, Dubourg O, Desnos M, Mirochnik R, Isnard G, Bonne G, Carrier L, Guicheney P, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M.** Familial hypertrophic cardiomyopathy. Cardiac ultrasonic abnormalities in genetically affected subjects without echocardiographic evidence of left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J* 1998; 19:490-499.
 20. **Fananapazir L, Epstein ND.** Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy: limitation of screening methods. *Circulation* 1995; 92:700-704.
 21. **Jarcho JA, McKenna WJ, Pare JA, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, Levi T, Donis-Keller H, Seidman JG, Seidman CE.** Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 1989; 321:372-378.
 22. **Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG.** A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta-myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990; 62:999-1006.
 23. **Watkins H, Mac Rae C, Thierfelder L, Chou YH, Frenneaux M, McKenna WJ, Seidman JG, Seidman CE.** A disease locus for familial hypertrophic cardiomyopathy maps to chromosome 1q3. *Nat Genet* 1993; 3:333-337.
 24. **Hoffmann B, Schmidt-Traub H, Perrot A, Osterziel KJ, Ge ner R.** First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2001; 17:524.
 25. **Thierfelder L, Mac Rae C, Watkins H, Tomfohde J, Williams M, McKenna WJ, Bohm K, Noeske G, Schlepper M, Bowcock A, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE.** A familial hypertrophic cardiomyopathy locus maps to chromosome 15q2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6270-6274.
 26. **Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann, JS, Guicheney P, Dufour C, Bereovici J, Dausse E, Berebbi-Bertrand I, Wisnewsky C, Pulvenis D, Fetler L, Vignal A, Weissenbach J, Hillaire D, Feingold J, Bouhour JB, Hagège A, Desnos M, Isnard R, Dubourg O, Komajda M, Schwartz K.** Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet* 1993; 4:311-313.

27. Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1997; 16:379-382.
28. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 1996; 13: 63-69.
29. MacRae CA, Ghaisas N, Kass S, Donnely S, Basson CT, Watkins HC, Anan R, Thierfelder LH, McGarry K, Rowland E, McKenna WJ, Seidman JG, Seidman CE. Familial hypertrophic cardiomyopathy with Wolff-Parkinson-White syndrome maps to a locus on chromosome 7q3. *J Clin Invest* 1995; 96:1216-1220.
30. Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Eglebad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin Invest* 1999; 103:R39-R43.
31. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262:411-417.
32. Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, Kunst H, Schattteman I, Van Velzen D, Meyers J, Ensink RJ, Verstreken M, Declau F, Marres H, Kastury K, Bhasin S, McGuirt WT, Smith RJH, Cremers CWRJ, Van de Heyning P, Willems PJ, Smith SD, Van Camp G. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Molec Genet* 1999; 8:1321-1328.
33. Gollob MH, Green, MS, Tang AS-L, Gollob T, Karibe A, Al Sayegh AH, Ahmad F, Lozado R, Shah G, Fananapazir L, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Eng J. Med* 2001; 344:1823-1831.
34. Takeda N. Cardiomyopathies and mitochondrial DNA mutations. *Mol Cell Biochem* 1997; 176:287-290.
35. Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17:242-252.
36. Craig R, Padrón R. Molecular structure of the sarcomere. En: A.G. Engel and C. Franzini-Armstrong, Eds. *Myology*. 3rd Ed. McGraw-Hill.
37. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 1993; 261:50-56.
38. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 76:371-423.
39. Padrón R, Álamo L, Murgich J, Craig R. Towards an atomic model of the thick filaments of muscle. *J Mol Biol* 1998; 275: 35-41.
40. Flavigny J, Richard P, Isnard R, Carrier L, Charron P, Bonne G, Forissier J-F, Desnos M, Dubourg O, Komajda M, Schwartz K, Hainque B. Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Med* 1998; 76:208-214.
41. Szczesna D, Ghosh D, Li Q, Gomes AV, Guzman G, Arana C, Zhi G, Stull JS, Potter JD. Familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in the regulatory light chains of myosin affect their structure, Ca²⁺ binding, and phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 7086-7092.
42. Morano I. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J. Mol. Med* 1999; 77:544-555.

43. **Sweeney HL, Bowman BF, Stull J.** Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am J Physiol* 1993; 264:C1085-C1095.
44. **Hofmann PA, Hartzell HC, Moss RL.** Alterations in Ca²⁺ sensitive tension due a partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 1991; 97: 1141-1163.
45. **Weisberg A, Winegrad S.** Alteration of myosin cross bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:8999-9003.
46. **Dennis JE, Shimizu T, Reinach FC, Fischman DA.** Localization of C-protein isoforms in chicken skeletal muscle: ultrastructure detection using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1984; 98: 1514-1522.
47. **Mercadier JJ, Bouveret P, Gorza L, Schiaffino S, Clark WA, Zak R, Swynghedauw B, Schwartz K.** Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human myocardium. *Circ Res* 1983; 53:52-62.
48. **Jaenicke T, Diederich KW, Haas W, Schleigh J, Lichter P, Pfordt Bach A, Vosberg HP.** The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain and a comparative analysis of its product. *Genomics* 1990; 8: 194-206.
49. **Miyata S, Minobe W, Briston MR, Leinwald LA.** Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 2000; 86:386-390.
50. **Nakao K, Minobe W, Roden R, Briston MR, Leinwald LA.** Myosin heavy chain expression in human heart failure. *J Clin Invest* 1997; 100: 2362-2370.
51. **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.
52. **Dausse E, Komajda M, Dubourg O, Fetler L, Dufour C, Carrier L, Wisnewsky C, Bercovici J, Hengstenberg C, Al-Mahdawi S, Isnard R, Hagège A, Bouhour JB, Desnos M, Beckmann JS, Weissenbach J, Schwartz K, Guicheney P.** Familial hypertrophic cardiomyopathy: microsatellite haplotyping and identification of a hot-spot for mutations in β -myosin heavy chain gene. *J Clin Invest* 1993; 92: 2807-2813.
53. **Fananapazir L, Dalakas MD, Cyran F, Cohn G, Epstein ND.** Missense mutations in the β myosin heavy chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3993-3997.
54. **Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Eguchi N, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K.** A novel deletion mutation in the β -myosin heavy chain gene found in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2607-2612.
55. **Charron P, Carrier L, Dubourg O, Tesson F, Desnos M, Richard P, Bonne G, Guicheney P, Hainque B, Bouhour J, Mallet A, Feingold J, Schwartz K, Komajda M.** Penetrance of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Genet Couns* 1997; 8:107-114.
56. **Marian AJ, Yu QT, Mares A, Hill R, Roberts R, Perryman MB.** Detection of a new mutation in the β myosin heavy chain in an individual with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1992; 90:2156-2165.
57. **Nishi H, Kimura A, Matsuyama K, Koga Y, Sasazuki T, Toshima H.** Two distinct mutations of cardiac β myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1993; 88 (suppl. 1): 1-343.
58. **Rayment I, Holden HM, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND.** Structural interpretation of the mutations in the β -cardiac myosin that have implicated in the familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3864-3868.
59. **Epp TA, Dixon IMC, Wang H-Y, Sole M, Liew C-C.** Structural organization of the human cardiac alpha-myosin heavy chain gene (MYH6). *Genomics* 1993; 18: 505-509.

60. **Nimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE.** Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002; 105:446-451.
61. **Eden D, Highsmith S.** Light chain-dependent by transient electrical birefringence. *Biophys J* 1997; 73:958-972.
62. **Epstein D.** The molecular biology and pathophysiology of hypertrophic cardiomyopathy due to mutations in the beta myosin heavy chains and the essential and regulatory light chains. *Adv Exp Med Biol* 1998; 453:105-115.
63. **Andersen PS, Havndrup O, Bungaard H, Moolman-Smook, JC, Larsen LA, Mogensen J, Brink PA, Børglum AD, Corfield VA, Kjeldsen K, Vuust J, Christiansen M.** Myosin light chain mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy: phenotypic presentation and frequency in Danish and South African populations. *J Med Genet* 2001 38: E43.
64. **Ikebe M, Reardon S, Schwonek JP, Sanders CR, Ikebe R.** Structural requirement of the regulatory light chain of smooth muscle myosin as a substrate for myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 1994; 269:28165-28172.
65. **Trybus KM, Waller GS, Chatman TA.** Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain. *J Biol Chem* 1994;124: 963-969.
66. **Vemuri R, Lankford EB, Poetter K, Hassanzadeh S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Epstein ND.** The stretch-activation response may be critical to the proper functioning of the mammalian heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 274:1048-1053.
67. **Anderson AAW, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, Allen PD, Kay BK.** Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res* 1995; 76:681-686.
68. **Mesnard L, Logeart D, Taviaux S, Diriong S, Mercadier JJ, Samson F.** Human cardiac troponin T: cloning and expression of new isoforms in the normal and failing heart. *Circ Res* 1995; 76:687-692.
69. **Townsend P, Barton P, Yacoub M, Farza H.** Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: expression in developing and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2223-2236.
70. **Townsend P, Farza H, MacGeoch C, Spurr NK, Wade R, Gahlmann R, Yacoub MH, Barton PJR.** Human cardiac troponin T: identification of fetal isoforms and assignment of the TNNT2 locus to chromosome 1q. *Genomics* 1994; 21:311-316.
71. **Jing P, Huang QQ, Yeh HI, Lin JJC.** Complete nucleotide sequence and structural organization of rat cardiac troponin gene: a single gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternative splicing. *J Mol Biol* 1992; 227:1269-1276.
72. **Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Limas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JC, Seidman CE.** Tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994; 77:701-712.
73. **Forissier JF, Carrier L, Farza H, Bonne G, Bereovici J, Richard P, Hainque B, Townsend PJ, Yacoub MH, Fauré S, Dubourg O, Millaire A, Hagège A, Desnos M, Komajda M, Schwartz K.** Codon 102 of the cardiac troponin T gene is a putative hot spot for mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1996; 94:3069-3073.
74. **Zot AS, Potter JD.** Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann Rev Biophys Chem* 1987; 16: 535-559.
75. **Perry SV.** Troponin. Genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 1998; 19:575-602.
76. **Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O' Donohue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG, Seidman CE.** Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995; 332: 1058-1064.
77. **Anan R, Shono H, Kisanuki A, Arima S, Nakao S, Tanaka H.** Patients with familial

- hypertrophic cardiomyopathy caused by a Phe110Ile missense mutation in the cardiac troponin T gene have variable cardiac morphologies and a favorable prognosis. *Circulation* 1998; 98:391-397.
78. **Elliot PM, D' Cruz L, McKenna WJ.** Late-onset hypertrophic cardiomyopathy caused by a mutation in the cardiac troponin gene. *N Engl J Med* 1999; 341:1855-1856.
79. **Solaro RJ, Van Eyk J.** Altered interactions among thin filament proteins modulates cardiac function. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:217-230.
80. **Rarick HM, Tu XH, Solaro RJ, Martin AF.** The C-terminus of cardiac troponin I is essential for full inhibitory activity and Ca²⁺ sensitivity of rat myofibrils. *J Biol Chem* 1997; 272:26887-26892.
81. **Yamauchi-Takahara K, Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Fujio Y, Kunisada K, Nagata S, Kishimoto T.** Clinical implications of hypertrophic cardiomyopathy associated with mutations in the alpha-tropomyosin gene. *Heart* 1996; 76: 63-65.
82. **Nakajima-Taniguchi C, Matsui H, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K.** Novel missense mutation in the alpha-tropomyosin gene found in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2053-2058.
83. **Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, Pellegrino MA, Maron BJ, Spirito P, Watkins H, Reggiani C.** A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res* 1998; 82:106-115.
84. **Karibe A, Tobacman LS, Strand J, Butters C, Back N, Bachinski LL, Arai AE, Ortiz A, Roberts R, Homsher E, Fananapazir L.** Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis. *Circulation* 2001; 103:65-71.
85. **Bonne G, Carrier L, Bercevic J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckman JS, Weissenbach J, Vosberg HP, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K.** Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1995; 11:438-440.
86. **Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S.** Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J* 1995; 14: 1952-1960.
87. **Carrier L, Bonne G, Bährend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruaud C, Gary F, Labeit S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagège AA, Trent RJ, Komajda M, Schwartz K.** Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1997; 80:427-434.
88. **Einheber S, Fischman DA.** Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: an intracellular member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2157-2161.
89. **Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE.** Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1995; 11:434-437.
90. **Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna WJ, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE.** Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 338:1248-1257.
91. **Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, Isnard R, Hagège A, Langlard JM, Bonne G, Richard P, Hainque B, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M.** Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the

- cardiac myosin-binding protein C. *Circulation* 1998; 97:2230-2236.
92. **St. Martin JS, Epstein JA.** Hypertrophic cardiomyopathy: beyond the sarcomere. *N Engl J Med* 1998; 338:1303-1304.
 93. **Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T.** Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:5901-5905.
 94. **Shows T, Eddy RL, Haley L, Byers M, Henry M, Gunning P, Ponte P, Kedes L.** The coexpressed genes for human alpha (ACTA) and cardiac actin (ACTC) are on chromosomes 1 and 15, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 37:583.
 95. **Olson TM, Doan TP, Kishimoto NY, Whitby FG, Ackerman MJ, Fananapazir L.** Inherited and the novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:1687-1694.
 96. **Pelin K, Ridanpaa M, Donner K, Wilton S, Krishnarajah J, Laing N, Kolmerer B, Millevoi S, Labeit S, de la Chapelle A, Wallgren-Pettersson C.** Refined localization of the genes for nebulin and titin on chromosome 2q allows the assignment of nebulin as a candidate for autosomal recessive nemaline myopathy. *Europ J Hum Genet* 1997; 5:229-234.
 97. **Labeit S, Kolmerer B.** Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 1995; 270:293-296.
 98. **Freiburg A, Gautel M.** A molecular map of the interactions between titin and myosin binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem* 1996; 235:317-323.
 99. **Geisterfer-Lowrance A, Christie ME, Giewat M, Conner DA, Ingwall JS, Shoen FJ, Seidman CE, Seidman JG.** A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 1996; 272:731-734.
 100. **Fatkin D, Christie ME, Aristizabal O, McDonnell BK, Srinivasan S, Schoen FJ, Seidman CE, Turnbull DH, Seidman JG.** Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the alpha cardiac myosin heavy chain gene. *J Clin Invest* 1999; 103:147-153.
 101. **Georgakopoulos D, Christie ME, Giewat M, Seidman CM, Seidman JG, Kass DA.** The pathogenesis of familial hypertrophic cardiomyopathy: early and evolving effects from an alpha-cardiac myosin heavy chain missense mutation. *Nat Med* 1999; 5: 327-330.
 102. **Kim SJ, Iizuka K, Kelly RA, Geng YJ, Bishop SP, Yang G, Kudej A, McDonnell BK, Seidman CE, Seidman JG, Vatner SF.** An alpha-cardiac myosin heavy chain gene mutation impairs contraction and relaxation function of cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1999; 276:H1780-1787.
 103. **Spindler M, Saupe KW, Christie ME, Sweeney HL, Seidman CM, Seidman JG, Ingwall JS.** Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998; 101:1775-1783.
 104. **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.
 105. **Blanchard E, Seidman CE, Seidman G, LeWinter M, Maughan D.** Altered crossbridge kinetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1999; 84:475-483.
 106. **Vemuri R, Lankford EB, Poetter K, Hassanzadeh S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Epstein ND.** The stretch-activation response may be critical to the proper functioning of the mammalian heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:1048-1053.
 107. **Sanbe A, Fewell JG, Gulick J, Osinka H, Lorenz J, Hall DG, Murray LA, Kimball TR, Witt SA, Robbins J.** Abnormal cardiac structure and function in mice expressing nonphosphorylatable cardiac regulatory myosin light chain 2. *J Biol Chem* 1999; 274:21085-21094.
 108. **Sanbe A, Nelson D, Gulik J, Setzer E, Osinka H, Wang X, Hewett TE, Klevitsky R, Hayes E, Warshaw DM, Robbins J.** *In vivo* analysis of an essential myosin light chain mutation linked to familial hypertro-

- phic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000; 87:296-302.
109. James J, Zhang Y, Wright K, Witt S, Glascock E, Osinka H, Klevitsky R, Martin L, Yaeger K, Sanbe A, Robbins J. Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:873-882.
 110. Yang Q, Sanbe A, Osinka H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998; 102:1292-1300.
 111. Yang Q, Sanbe A, Osinka H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J. *In vivo* modeling of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1999; 85:841-847.
 112. Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ Res* 2002; 90:594-601.
 113. Dalloz F, Osinka H, Robbins J. Manipulating the contractile apparatus: genetically defined animal models of cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:9-25.
 114. Muthuchamy M, Pieples K, Rethinasamy P, Hoit B, Grupp IL, Boivin GP, Wolska B, Evans C, Solaro RJ, Wieczorek DF. Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction. *Circ Res* 1999; 85:47-56.
 115. Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, Pellegrino MA, Maron BJ, Spirito P, Watkins H, Reggiani C. A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res* 1998; 82:106-115.
 116. Blanchard EM, Irizuka K, Christie M, Conner DA, Geisterfer-Lowrance A, Schoen FJ, Maughan DW, Seiman CE, Seidman JG. Targeted ablation of the murine alpha-tropomyosin gene. *Circ Res* 1997; 81:1005-1010.
 117. Rethinasamy P, Muthuchamy M, Hewett T, Boivin G, Wolska BM, Evans C, Solaro RJ, Wieczorek DF. Molecular and physiological effects of alpha-tropomyosin ablation in the mouse. *Circ Res* 1998; 82:116-123.
 118. Bing W, Knott A, Redwood C, Esposito G, Purcell I, Watkins H, Maston S. Effect of hypertrophic cardiomyopathy mutations in human cardiac muscle alpha-tropomyosin (Asp175Asn and Glu180Gly) on the regulatory properties of human cardiac troponin determined by in vitro motility assay. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:1489-1498.
 119. Oberts L, Zhao G, Park JT, Brugada R, Michael LH, Entman ML, Roberts R, Marian AJ. Dominant-negative effect of a mutant cardiac troponin T on cardiac structure and function in transgenic mice. *J Clin Invest* 1998; 102:1498-1505.
 120. Lim DS, Oberst L, McCluggage M, Yunker K, Lacy J, DeMayo F, Entman ML, Roberts R, Michael LH, Marian AJ. Decreased left ventricular ejection fraction in transgenic mice expressing mutant cardiac troponin T-q(92), responsible for human hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:365-374.
 121. Yu Q, Zhao G, Marian AJ. *In vivo* short-term expression of a hypertrophic cardiomyopathy mutation in adult rabbit myocardium: myofibrillar incorporation without early disarray. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 104:469-481.
 122. Elliot K, Watkins H, Redwood CS. Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2000; 275:22069-22074.
 123. James J, Zhang Y, Osinka H, Sanbe A, Klevitsky R, Hewett TE, Robbins J. Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000; 87:805-811.
 124. Nagueh SF, Bachinski L, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW, Quiñones MA, Roberts R, Marian AJ. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardium abnormalities in patients with familial hypertrophic cardiomyopathy and provides a novel means for an early diagnosis before and in-

- dependently of hypertrophy. *Circulation* 2001; 104:128-130.
125. **Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L, Sweeney HL.** Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1995; 95:1409-1414.
126. **Malinchik S, Cuda G, Podolsky RJ, Horowitz R.** Isometric tension and mutant myosin heavy chain content in single skeletal myofibers from hypertrophic patients. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:667-676.
127. **Marian AJ.** Pathogenesis of diverse, clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2000; 355:58-60.
128. **Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Younker K, Evans A, Entman M, Roberts R, Marian AJ.** Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103: 789-791.
129. **Oi S, Haneda T, Osaki J, Kashiwagi Y, Nakamura Y, Kawabe J, Kikuchi K.** Lovastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat Herat cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 34:439-444.
130. **Su SF, Hsiao CL, Chu CW, Lee BC, Lee TM.** Effects of pravastatin on left ventricular mass in patients with hyperlipidemia and essential hypertension. *Am J Cardiol* 2000; 86:514-518.
131. **Patel R, Nagueh SF, Tsybouleva N, Abdellatiff M, Lutucuta S, Kopelen HA, Quiñones MA, Zoghbi WA, Entman ML.** Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 104:317-324.
132. **Arad M, Seidman JG, Seidman CE.** Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2499-2506.
133. **Towbin JA, Bowles NE.** The failing heart. *Nature* 2002; 415:227-233.
134. **Offer G. and Knight P.** The structure of the head-tail junction of the myosin molecule. *J Mol Biol* 1996; 256:407-416.
135. **Offer G, Knight P, Burgess SA, Álamo L, Padrón, R.** A new model for the surface arrangement of myosin molecules in heads in tarantula thick filaments. *J Mol Biol* 2000; 298:239-260.
136. **Marti-Renon MA, Stuart A, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A.** Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29:291-325.